

# THESES

présentées à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

**Pol E. Bernard DEMANGE**

---

*PREMIÈRE THÈSE :* IDENTIFICATION DE CERTAINS SUCRES DU LAIT PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES ET ESSAI D'HYDROLYSE TOTALE DU LACTOSE PAR VOIE ENZYMATIQUE.

*DEUXIÈME THÈSE :* PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.

---

Soutenues publiquement le 26 Février 1965, devant la Commission d'Examen

Jury :

|                |       |                 |
|----------------|-------|-----------------|
| MM. A. VEILLET | ..... | Président       |
| B. CONDE       | }     | .....Examineurs |
| R. FRENTZ      |       |                 |







# THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

**Pol E. Bernard DEMANGE**

---

*PREMIÈRE THÈSE :* IDENTIFICATION DE CERTAINS SUCRES DU LAIT PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES ET ESSAI D'HYDROLYSE TOTALE DU LACTOSE PAR VOIE ENZYMATIQUE.

*DEUXIÈME THÈSE :* PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.

---

Soutenues publiquement le 26 Février 1965, devant la Commission d'Examen

Jury :

MM. A. VEILLET ..... Président

B. CONDE

R. FRENTZ

}  
}

.....Examineurs

Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41555810\\_0017](https://archive.org/details/IA41555810_0017)

UNIVERSITE DE NANCY - FACULTE DES SCIENCES

Doyen : M. AUBRY

Assesseur : M. GAY

Doyens honoraires : MM. CORNUBERT - DELSARTE - URION - ROUBAULT

Professeurs honoraires : MM. CROZE - RAYBAUD - LAFFITTE - LERAY - JOLY - LAPORTE - EICHHORN - CAPELLE - GODEMENT - DUBREIL - L. SCHWARTZ - DIEUDONNE - de MALLEMANN - LONGCHAMBON - LETORT - DODE - GAUTHIER - GOUDET - DIMER - CORNUBERT CHAPELLE - GUERIN - CHEVALLIER - WAHL.

Maîtres de conférences honoraires : LIENHART - PIERRET

PROFESSEURS

|          |                                 |            |                       |
|----------|---------------------------------|------------|-----------------------|
| MM.      |                                 |            |                       |
| URION    | Chimie biologique               | GAYET      | Physiologie           |
| DELSARTE | Analyse supérieure              | MANGENOT   | Phytopathologie       |
| ROUBAULT | Géologie                        | MALAPRADE  | Chimie                |
| VEILLET  | Biologie animale                | HADNI      | Physique              |
| BARRIOL  | Chimie théorique                | BONVALET   | Mécanique physique    |
| BIZETTE  | Physique                        | KERN       | Minéralogie           |
| GUILLIEN | Electronique                    | BASTICK    | Chimie                |
| GIBERT   | Chimie physique                 | DUCHAUFOR  | Pédologie             |
| LEGRAS   | Mécanique rationnelle           | NEEL       | Chimie ind.organique  |
| BOLFA    | Minéralogie                     | GARNIER    | Agronomie             |
| NICLAUSE | Chimie                          | WEPPE      | Minéralogie appliquée |
| FAIVRE   | Physique appliquée              | BERNARD    | Géologie appliquée    |
| AUBRY    | Chimie minérale                 | CHAMPIER   | Physique              |
| DUVAL    | Chimie                          | REGNIER    | Physico-chimie        |
| COPPENS  | Radiogéologie                   | GAY        | Chimie biologique     |
| FRUHLING | Physique                        | WERNER     | Botanique             |
| SUHNER   | Physique expérimentale          | CONDE      | Zoologie              |
| HILLY    | Géologie                        | STEPHAN    | Zoologie              |
| LE GOFF  | Génie chimique                  | EYMARD     | Cal. Dif. et Int.     |
| CHAPON   | Chimie <del>technologique</del> | LEVISALLES | Chimie organique      |
| HEROLD   | Chimie industrielle             | N.         | Botanique             |
| SCHWARTZ | Exploit. minière                | N.         | Physique              |
|          |                                 | N.         | M.M.P.                |

MAITRES DE CONFERENCES ET PROFESSEURS SANS CHAIRE

|             |                      |           |                          |
|-------------|----------------------|-----------|--------------------------|
| MM.         |                      |           |                          |
| GOSSE       | Mécanique physique   | MARI      | Chimie I.S.I.N.          |
| ROCCI       | Géologie             | LAFON     | Physique I.S.I.N.        |
| VUILLAUME   | Psychophysiologie    | FELDEN    | Phys.Théor. et Nucl.     |
| Mme BASTICK | Chimie M.P.C. Epinal | FLSCHON   | M.P.C.                   |
| GUDEFIN     | Physique             | VIGNES    | Physique (Mines)         |
| HORN        | Physique             | Mle HUET  | Math. (S.P.C.N.)         |
| FRENTZ      | Biologie animale     | DEVIOT    | Physique du solide       |
| Mme HERVE   | Math.(Propédeutique) | BLAZY     | Minéralogie appl.(Géol.) |
| AUROUZE     | Géologie             | BALESDENT | Thermo.chim.appliquée    |
|             |                      | JANOT     | Phys. M.P.C. Epinal      |

SECRETAIRE PRINCIPAL : C. CARON



## IDENTIFICATION DE CERTAINS SUCRES DU LAIT

### PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES

### ET ESSAI D'HYDROLYSE TOTALE DU LACTOSE

### PAR VOIE ENZYMATIQUE



## A V A N T - P R O P O S

---

Les premières lignes de ce mémoire sont l'imparfaite cristallisation de mon indéfectible reconnaissance à l'égard de M. le Professeur A. VEILLET, Directeur de l'Ecole de Laiterie de la Faculté des Sciences et de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Nancy. Elle est, tout d'abord, celle de l'étudiant de licence, puis celle de celui de l'Ecole de Laiterie, qui, à travers de très nombreux cours magistraux, a pu, hormis des connaissances d'avant - garde, apprendre, à l'image de la personnalité de son Professeur et probablement, hélas, en élève trop peu studieux, l'essence de la discussion riche d'enseignements, la lutte constructive et l'indispensable compréhension humaine. Elle est ensuite celle de l'enseignant, heureux d'avoir été choisi, pour l'occasion qui lui était offerte de combler ses lacunes et d'initier, le moins mal possible, quelques-uns à la Chimie laitière. C'est encore celle du chercheur pour le soutien moral et l'aide intellectuelle et matérielle dont la deuxième thèse présentée a, en particulier, si largement profité.

Ma fidèle gratitude va également à M. le Professeur R. FRENTZ dont, jadis, les travaux pratiques par lui organisés, m'avaient dévoilé la profonde objectivité d'esprit que j'ai trouvée alliée, au cours des deux à trois années passées sous sa compétente direction théorique et technique, à une si sereine et reposante, mais efficiente, vue des événements.

M. le Professeur B. CONDE trouvera ici la tangibilité de mes respectueux remerciements pour son acceptation d'avoir bien voulu être l'un des membres de mon jury.

Mme A. VEILLET, M. F. WEBER, M. S. AUBE voudront également voir ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour les enseignements dont ils m'ont fait bénéficier et la chaude amitié qu'ils m'ont ensuite témoignée.

Je remercie le Secrétariat des différents travaux que j'ai pu demander et qui furent réalisés si rapidement et sympathiquement. L'aide extérieure de M. MARINE aux travaux de photographie, et de Melle G. BONNEVILLE aux travaux de dactylographie a été justement appréciée.

Le Laboratoire de Chimie laitière, où je me suis intégré avec tant de plaisir, sera ma dernière cible. Mme NOVAK, Mme MARINE au travail régulier et consciencieux, Mme PYSNIAK sont l'objet de ma gratitude pour leur collaboration technique. Que M. B. TARODO de la FUENTE trouve ici mes pensées reconnaissantes pour son amitié encourageante.



# S O M M A I R E

I  
PAGES

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>INTRODUCTION</u>                                                                                                              | 1  |
| <u>CHAPITRE 1<sup>er</sup></u> : APPLICATION de la CHROMATOGRAPHIE en COUCHES MINCES à l'IDENTIFICATION des SUCRES dans un LAIT. | 2  |
| I - <u>PRINCIPE</u>                                                                                                              | 2  |
| II - <u>RECHERCHE D'UN MODE OPERATOIRE</u>                                                                                       | 2  |
| A - Recherche du support.                                                                                                        | 3  |
| 1 - Détermination du gel.                                                                                                        | 3  |
| a - Nature du gel.                                                                                                               | 3  |
| b - Quantité de gel.                                                                                                             | 3  |
| c - Activation du gel.                                                                                                           | 3  |
| 2 - Nature du diluant.                                                                                                           | 4  |
| a - Tampon Sørensen.                                                                                                             | 4  |
| b - Acide borique N/10.                                                                                                          | 4  |
| c - Eau distillée.                                                                                                               | 4  |
| 3 - Conclusion : support adopté.                                                                                                 | 6  |
| B - Détermination de l'éluant.                                                                                                   | 6  |
| C - Recherche du révélateur.                                                                                                     | 6  |
| D - Technique adoptée.                                                                                                           | 9  |
| 1 - Confection des plaques.                                                                                                      | 9  |
| 2 - Dépôts.                                                                                                                      | 10 |
| a - Préparation des plaques.                                                                                                     | 10 |
| b - Quantités déposées.                                                                                                          | 10 |
| c - Mode de dépôt.                                                                                                               | 12 |
| - Considérations générales.                                                                                                      | 12 |
| - Dépôts proprement dits.                                                                                                        | 12 |
| 3 - Migration.                                                                                                                   | 12 |
| a - Préparation de la cuve.                                                                                                      | 12 |
| b - Migration proprement dite.                                                                                                   | 13 |
| 4 - Révélation.                                                                                                                  | 13 |
| a - Séchage préliminaire de la plaque.                                                                                           | 13 |
| b - Aspersión.                                                                                                                   | 14 |
| c - Etuvage.                                                                                                                     | 14 |



|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5 - Lecture du chromatogramme.                                                                              | 14 |
| a - Lecture en lumière normale.                                                                             | 14 |
| b - Lecture en lumière ultra-violette.                                                                      | 14 |
| <u>III - RESULTATS</u>                                                                                      | 15 |
| A - Résumé du but poursuivi.                                                                                | 15 |
| B - Résumé du principe.                                                                                     | 15 |
| C - Protocole de l'analyse.                                                                                 | 15 |
| 1 - Obtention du filtrat.                                                                                   | 15 |
| a - Matériel et réactifs nécessaires.                                                                       | 15 |
| b - Obtention proprement dite.                                                                              | 15 |
| - Cas des laits normaux ou formolés.                                                                        | 15 |
| - Cas des laits bichromatés.                                                                                | 16 |
| 2 - Chromatographie.                                                                                        | 17 |
| a - Réactifs nécessaires.                                                                                   | 17 |
| b - Mode opératoire basé sur un exemple.                                                                    | 17 |
| - Préparation de la cuve.                                                                                   | 18 |
| - Préparation de la plaque.                                                                                 | 18 |
| - Dépôts.                                                                                                   | 19 |
| - Migration.                                                                                                | 19 |
| 3 - Résultats.                                                                                              | 19 |
| a - Lecture en lumière normale.                                                                             | 19 |
| b - Lecture en lumière ultra-violette.                                                                      | 20 |
| c - Conclusions propres à notre essai.                                                                      | 20 |
| <u>IV - CONCLUSION GENERALE</u>                                                                             | 22 |
| 1 - Technique de Mme RUIZ.                                                                                  | 22 |
| a - Produits nécessaires.                                                                                   | 22 |
| b - Matériel de chromatographie.                                                                            | 23 |
| c - Obtention de la solution à chromatographier.                                                            | 23 |
| d - Chromatographie.                                                                                        | 23 |
| - Préparation de la feuille de papier.                                                                      | 23 |
| - Préparation de la cuve.                                                                                   | 23 |
| - Migration.                                                                                                | 23 |
| - Révélation ; lecture du chromatogramme.                                                                   | 24 |
| 2 - Comparaison de la méthode de Mme RUIZ et de la méthode proposée.                                        | 24 |
| a - Différences au point de vue rapidité de manipulation.                                                   | 24 |
| b - Simplification des manipulations.                                                                       | 24 |
| 3 - Limites de la méthode.                                                                                  | 25 |
| <u>CHAPITRE II : ESSAI d'HYDROLYSE TOTALE du LACTOSE dans UN LAIT par ACTION d'une LACTASE COMMERCIALE.</u> | 26 |
| 1 - <u>PRINCIPE</u>                                                                                         | 26 |
| 1 - Base du principe.                                                                                       | 26 |
| 2 - Objections possibles.                                                                                   | 26 |
| - Réactions de transfert.                                                                                   | 26 |
| - Présence de conservateurs dans le lait.                                                                   | 27 |



|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3 - Conclusion : Schéma opératoire théorique adopté.                                                    | 27 |
| II - <u>DETERMINATION des CONDITIONS d'ACTION, SUPPOSEES les MEILLEURES, d'une LACTASE COMMERCIALE.</u> | 27 |
| A - Principe.                                                                                           | 27 |
| B - Technique.                                                                                          | 28 |
| 1 - Matériel nécessaire.                                                                                | 28 |
| a - Matériel d'hydrolyse.                                                                               | 28 |
| b - Matériel de chromatographie.                                                                        | 29 |
| 2 - Réactifs nécessaires.                                                                               | 29 |
| a - Réactifs d'hydrolyse.                                                                               | 29 |
| b - Réactifs de chromatographie.                                                                        | 29 |
| 3 - Mode opératoire.                                                                                    | 29 |
| a - Conduite de l'hydrolyse.                                                                            | 29 |
| b - Chromatographie.                                                                                    | 30 |
| - Chromatographie proprement dite.                                                                      | 30 |
| - Révélation et lecture du chromatogramme.                                                              | 31 |
| C - Résultats.                                                                                          | 31 |
| 1 - Résultats accessoires à l'étude en cours.                                                           | 31 |
| a - Etude de l'évolution d'une réaction enzymatique.                                                    | 31 |
| b - Exemple d'hydrolyse lente, moyenne ou rapide.                                                       | 32 |
| - Hydrolyse lente.                                                                                      | 32 |
| - Hydrolyse moyenne.                                                                                    | 32 |
| - Hydrolyse rapide.                                                                                     | 32 |
| 2 - Résultats concernant les conditions d'action les plus favorables de la Bêta-galactosidase étudiée.  | 34 |
| a - Détermination approximative des facteurs conduisant à une hydrolyse enzymatique rapide du lactose.  | 34 |
| b - Détermination plus précise des facteurs conduisant à l'hydrolyse enzymatique rapide recherchée.     | 34 |
| - Action de la force ionique.                                                                           | 34 |
| - Action du pH                                                                                          | 35 |
| - Action de la température.                                                                             | 35 |
| 3 - Recherche d'activateurs éventuels.                                                                  | 35 |
| D - Conclusion                                                                                          | 35 |
| III - <u>ESSAI D'APPLICATION à l'HYDROLYSE TOTALE du LACTOSE dans un LAIT.</u>                          | 36 |
| A - Principe.                                                                                           | 36 |
| B - Technique d'hydrolyse de Mme RUIZ.                                                                  | 36 |
| 1 - Matériel nécessaire                                                                                 | 36 |
| a - Matériel de défécation                                                                              | 36 |
| b - Matériel d'hydrolyse                                                                                | 36 |



|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2 - Réactifs nécessaires                                                     | 36 |
| a - Réactifs de défécation.                                                  | 36 |
| b - Réactifs d'hydrolyse.                                                    | 37 |
| 3 - Hydrolyse                                                                | 37 |
| a - Obteption du filtrat dont le lactose supporte l'hydrolyse.               | 37 |
| b - Conduite de l'hydrolyse.                                                 | 37 |
| 4 - Dosage des sucres.                                                       | 37 |
| C - Technique d'hydrolyse expérimentée.                                      | 37 |
| 1 - Matériel nécessaire                                                      | 37 |
| a - Matériel d'hydrolyse.                                                    | 37 |
| b - Matériel de défécation.                                                  | 40 |
| 2 - Réactifs nécessaires                                                     | 40 |
| a - Réactifs d'hydrolyse.                                                    | 40 |
| b - Réactifs de défécation.                                                  | 40 |
| 3 - Hydrolyse                                                                | 40 |
| a - Conditions d'hydrolyse.                                                  | 40 |
| b - Conduite de l'hydrolyse.                                                 | 43 |
| c - Contrôle de l'hydrolyse.                                                 | 43 |
| 4 - Dosage des sucres                                                        | 44 |
| a - Défécation .                                                             | 44 |
| b - Dosage proprement dit.                                                   | 45 |
| D - Résultats proprement dits.                                               | 45 |
| 1 - Résultats relatifs à l'étude en cours                                    | 45 |
| a - Résultats concernant les laits bichromatés.                              | 45 |
| - Laits bichromatés moyennement altérés.                                     | 45 |
| - Laits bichromatés fortement altérés.                                       | 45 |
| b - Résultats concernant les laits formolés.                                 | 45 |
| 2 - Résultats accessoires à l'étude en cours : confirmation de faits connus. | 48 |
| E - Discussion et conclusion.                                                | 48 |
| 1 - Discussion.                                                              | 48 |
| 2 - Conclusion et travail restant à faire.                                   | 40 |
| RESUME et CONCLUSION.                                                        | 50 |
| BIBLIOGRAPHIE.                                                               | 52 |



## I N T R O D U C T I O N

La recherche du mouillage d'un lait implique généralement le calcul de sa constante moléculaire simplifiée (ou CMS), qui fait entrer en jeu sa teneur en chlorures et en lactose. Or, en particulier dans le cas de laits altérés, la détermination du taux du diboloside nécessite certaines précautions ; pour nous en convaincre, il suffit de lire dans le "Recueil des Méthodes officielles d'analyse physique et chimique du lait " (16) p. 44. "Il y a lieu de toujours tenir compte d'un début d'hydrolyse possible du lactose, pour la validité des résultats. La présence de galactose et de glucose, du fait de l'hydrolyse, peut-être facilement décelée par chromatographie sur papier."

C'est à Mme RUIZ que revient le mérite d'avoir déterminé la dose maxima de lactose hydrolysé tolérée par litre, et d'avoir rendu possible sa détection à l'aide de la technique de chromatographie sur papier ; c'est cet auteur, encore, qui a élaboré une méthode d'hydrolyse totale du lactose, par voie acide, qu'il est nécessaire d'utiliser lorsque glucose et galactose sont en quantité supérieure à celle admise.

La valeur des méthodes précitées n'est pas contestée ; mais, elles sont longues et relativement complexes. Ainsi avons-nous songé, au cours d'un premier chapitre, à adapter la technique de chromatographie en couches minces à l'identification des sucres dans un lait ; cette adaptation a pour but de déterminer, d'une manière aisée et rapide, si un lait contient du lactose hydrolysé en quantité trop importante. Dans un second chapitre, nous recherchons une éventuelle possibilité de scinder, par voie enzymatique, rapidement et totalement le lactose de laits conservés ; nous y effectuons, après établissement des conditions d'une action optima d'une lactase commerciale, une comparaison entre les résultats fournis par l'hydrolyse acide de Mme RUIZ, prise comme référence, et l'hydrolyse biochimique proposée.



## CHAPITRE I

### APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES A L'IDENTIFICATION DES SUCRES DANS UN LAIT.

Dans un lait frais le dosage réductimétrique du lactose se fait en supposant que, théoriquement, le sucre n'est pas dégradé. En revanche, dans un lait où la fermentation lactique seule a déjà pris naissance, ce dosage ne peut être effectué qu'après hydrolyse totale du lactose, car la présence de glucose et de galactose, issus de la coupure du diholoside et précurseurs de l'acide lactique, perturbent le dosage direct du lactose. Or, Madame I. SAENZ LASCANO RUIZ (1) a montré qu'un gramme de lactose hydraté totalement hydrolysé par litre, et dosé donc sous la forme glucose-galactose, équivaut, au point de vue analytique, à 1,451 gramme de ce sucre dosé sous la forme intacte ; il en résulte que, vu l'exactitude du dosage du lactose par réductimétrie ( $\pm 0,3$  g/l), l'erreur commise dans ce cas précis (0,45 g/l) est supérieure à l'erreur admise ; mais, l'acceptation d'une quantité deux fois moindre de lactose hydrolysé par litre de lait conduit à une erreur de 0,225 g qui n'excède pas les limites de celle habituellement tolérée. En conséquence, le même auteur, empruntant à la technique de chromatographie sur papier sa puissance de résolution, a mis au point une méthode semi-quantitative permettant de déceler dans un lait la dose limite (0,5 g/l) de lactose hydrolysé n'ayant pas d'incidence sur les résultats d'un dosage ultérieur.

Nous nous proposons d'atteindre le même but, à l'aide de la technique de chromatographie en couches minces, beaucoup plus rapide.

#### I - PRINCIPE -

La méthode de chromatographie en couches minces, mise au point par STAHL en 1958 (3), sera employée. Cette méthode a déjà été étendue à l'étude de nombreux glucides (3 - 4) ; néanmoins, lors de la mise au point des différentes étapes de la technique proposée, différents essais seront rapportés dont la conclusion sera le choix des conditions de travail donnant le résultat jugé le plus favorable à notre cas particulier.

Ultérieurement, de manière à déterminer approximativement la quantité de lactose hydrolysé dans un litre de lait, il sera effectué, identiquement à la méthode de Madame I. SAENZ LASCANO RUIZ en chromatographie sur papier, une migration parallèle de solutions de lactose contenant des quantités connues de galactose et de glucose et d'un lactosérum de lait ; après révélation, l'intensité des taches obtenues sera comparée, d'où immédiatement une classification possible de ce lait dans une des catégories = lactose hydrolysé présent en quantité supérieure à 0,5 g/l ou inférieure à 0,5 g/l.

#### II - RECHERCHE D'UN MODE OPERATOIRE -

Le but que l'on se propose se résume à rechercher la possibilité de séparer aisément une forte quantité de lactose d'une faible quantité de glucose et de galactose (correspondant dans leur ensemble à 0,5 g de lactose hydrolysé par litre) par chromatographie en couches minces. Or, les facteurs susceptibles d'agir sont essentiellement le support de chromatographie, l'éluant et le révélateur. Il en ressort que la détermination des conditions + éventuellement



jugées les plus favorables impose la réalisation de différents essais, où chaque facteur sera étudié en le faisant varier dans un ensemble rigide, constitué par les autres agents de modifications éventuelles. La conclusion sera la description du mode opératoire où seront intégrées les conditions d'analyse adoptées.

## A - Recherche du support -

Le support de chromatographie est constitué d'un gel que l'on étend au moment de la préparation des plaques à un certain volume de liquide. La nature de ces deux constituants peut évidemment intervenir sur la séparation des sucres ; aussi étudierons-nous différents gels et diluants.

### 1 - Détermination du gel :

#### a - Nature :

Deux produits offerts par les promoteurs de la méthode ont essentiellement retenu notre attention : le Kieselgurh et le Kieselgel "G". Il se révèle conformément à ce qui est dit par STAHL (3), que le premier donne, en général, de moins bons résultats (il y a présence d'un effet de traînée important) avec des concentrations de sucres relativement grandes (10 gamma à 50 gamma / mm<sup>3</sup>), et qui sont celles que nous devrons employer ultérieurement. En revanche, dans ces conditions, le Kieselgel fournit des chromatogrammes acceptables ; en particulier, l'effet de traînée est assez peu accentué (sauf aux concentrations supérieures), l'élongation des taches est faible, et, en utilisant l'éluant adéquat, le lactose est nettement différencié du glucose et du galactose qui, eux-mêmes, bien que possédant dans ces conditions un Rf voisin, peuvent aussi (cela est fonction de la quantité de sucres mise en oeuvre) être séparés. C'est pourquoi ce support a été adopté.

#### b - Quantité :

STAHL (3) préconise de mélanger 30 g. de Kieselgel à 60 ml du diluant choisi. On peut se demander si, en faisant varier les proportions, on ne pourrait pas éventuellement améliorer la séparation des trois sucres. Il a aussi été préparé des plaques à partir de 40 g. de Kieselgel et 60 ml d'eau distillée ; ces plaques, dans les meilleures conditions, n'améliorent pas la séparation ; de plus, elles ont un grain moins fin et homogène que les plaques normales (30 g. additionné de 60 ml d'eau distillée), et sont assez fragiles par friabilité excessive. En conséquence, les essais dans ce domaine n'ont pas été poussés plus loin.

#### c - Activation du gel :

STAHL, encore, signale que, dans certains cas, l'activation du gel (par chauffage à 110 - 120 °C durant trente minutes environ) favoriserait le pouvoir de résolution de cette technique chromatographique. Le schéma n° 1 met en évidence que, dans le cas d'essai de séparation des glucose, lactose et galactose, cette activation, la chromatographie étant alors exécutée dans les conditions déterminées comme les plus favorables, n'améliore pas d'une manière nette la séparation ; comme de plus elle conduit à une légère complication de la technique de préparation du support, nous ne l'avons pas retenue.



## 2 - Nature du diluant :

Certains auteurs travaillent en incorporant à la poudre un diluant constitué de tampon Sörensen, d'acide borique N/10 ou simplement d'eau distillée. Les résultats chromatographiques qui en découlent sont variables ; en particulier :

### a - Le tampon Sörensen :

Son pH est de 6,8 ; il est réalisé avec 5 ml de  $\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K M}/15$  + 5 ml de  $\text{PO}_4 \text{Na}_2 \text{H}, 2 \text{H}_2 \text{O M}/15$  étendus à 1 litre. Incorporé à du Kieselgel il provoque la séparation lactose et glucose - galactose ; mais ces deux derniers oses ne sont pas scindés en deux taches bien délimitées ; en outre, le chromatogramme présente un effet de traînée relativement important. Ces inconvénients ont fait abandonner l'emploi du tampon Sörensen.

### b - L'acide borique N/10 (6,2 g dans un litre).

Par comparaison au diluant précédent, il améliore la figure donnée par les sucres ; il y a séparation lactose et glucose - galactose ; ces deux derniers, d'ailleurs, deviennent séparément perceptibles, malgré un certain effet de traînée.

### c - L'eau distillée :

Elle donne, de toute évidence, les meilleurs résultats ; à des concentrations en sucres favorables (inférieures à 10 gamma /mm<sup>3</sup>), les trois sucres étudiés sont scindés en trois taches différentes (bien que celles correspondant aux glucose et galactose soient très proches) ; l'effet de traînée, pour 10 gamma /mm<sup>3</sup>, est pratiquement nul ; à des concentrations supérieures il s'accroît, mais ne gêne pas la lecture. Tous ces avantages font que nous l'avons adoptée comme diluant.

Le schéma n° 2 met parfaitement en évidence les conclusions relatives à l'utilisation de l'acide borique et de l'eau distillée utilisés en tant que diluants.







### 3 - Conclusion : support adopté :

Le support choisi se déduit des constatations antérieures ; trente grammes de Kieselgel "G" seront ainsi intimement mélangés à 60 ml d'eau distillée ; les plaques obtenues, dont nous étudierons la confection plus tard, seront, après simple séchage à l'air, utilisées sans être activées.

Le gel à utiliser est ainsi déterminé. Les éléments qui le constituent auraient pu être autres, et peut-être meilleurs, et contribuer donc à satisfaire davantage ; néanmoins ce support sera, dans notre cas, considéré comme convenable, car il peut permettre une scission nette du lactose d'avec le glucose et galactose. Mais, d'autres facteurs primordiaux sont encore à déterminer, en particulier l'éluant de chromatographie.

### B - Détermination de l'éluant :

STHAL (3) propose, pour séparer glucose et galactose, d'utiliser le mélange :

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| - Méthyléthylcétone, dans les proportions | 60 |
| - Acide acétique ( $d = 1,055 - 1,064$ )  | 20 |
| - Méthanol                                | 20 |

Ce mélange permet effectivement la séparation du glucose d'avec le galactose lorsque la concentration en sucre n'est pas trop importante (environ 10 gamma /mm<sup>3</sup>) ; mais, en outre, il permet de scinder nettement, même à une forte concentration (50 gamma /mm<sup>3</sup>) le lactose du groupe glucose - galactose. Ce mélange éluant a donc été retenu. Le schéma n° 3 résume quelques essais où les concentrations relatives des constituants de l'éluant ont été modifiées, et montre que :

1 - Le mélange méthyléthylcétone 40, acide acétique 40, méthanol 20, permet la séparation du lactose des glucose - galactose, mais non celle de ces deux derniers.

2 - Le mélange 70 - 10 - 20 donne une figure chromatographique améliorée par rapport à la précédente.

3 - Le mélange 60 - 20 - 20 se révèle, dans notre cas, comme l'éluant le plus efficace.

### C - Recherche du révélateur -

Dans l'optique de nos recherches, il est particulièrement demandé au révélateur des sucres de permettre de déceler de très faibles quantités de lactose. Les différents mélanges révélateurs étudiés seront aussi sélectionnés en fonction de leur aptitude à mettre plus ou moins bien en évidence des quantités décroissantes de lactose.

La littérature propose de nombreux révélateurs dont nous avons retenu certains ; conjointement au nom du révélateur, il sera indiqué le mode de fabrication et d'emploi.



1 - O-Aminophénol et acide phosphorique.

Spray : dissoudre, au moment de l'emploi, 0,15 g d'o-aminophénol dans 20 ml d'éthanol à 96 %.

Compléter avec 10 ml d'acide phosphorique à 50 %.

2 - Acide 3,5 - dinitrobenzoïque.

Spray : solution à 1 % d'acide 3,5 - dinitrobenzoïque dans une solution 2n de carbonate de sodium.

Après spray, sécher le chromatogramme pendant 5 à 10 minutes à 100° C.

3 - Acide 3,5 - dinitrosalicylique.

Spray : solution à 0,5 % d'acide 3,5 - dinitrosalicylique dans une soude caustique à 4 %.

Traitement complémentaire : sécher rapidement le chromatogramme à température normale ; le maintenir ensuite pendant 4 à 5 minutes à 100° C.

4 - Chlorure de 2,3,5 - triphényltétrazole (TTC).

Spray : mélanger, immédiatement avant l'emploi, 1 volume d'une solution méthanolique à 4 % de TTC avec 1 vol. d'une solution méthanolique de soude caustique normale.

Traitement complémentaire : après spray, maintenir le chromatogramme humide sous l'action d'un jet de vapeur ou dans une étuve à 80° C. Le traitement par la chaleur est poursuivi jusqu'à ce que les taches rouges ressortent clairement sur un fond pratiquement incolore.

5 - Réactif à l'anisaldéhyde.

a - Spray : 1ml d'anisaldéhyde + 97 ml d'acide acétique + 2 ml de  $\text{SO}_4 \text{H}_2$  concentré.

- Etuvage : 6 m. à 120° C.

b - Spray : 0,5 ml d'anisaldéhyde + 10 ml d'acide acétique + 85 ml de méthanol + 5 ml de  $\text{SO}_4 \text{H}_2$  concentré.

Etuvage : 10 m. à 100° C.

c - Spray : 5 ml d'anisaldéhyde + 90 ml d'éthanol à 95 ° + 5 ml de  $\text{SO}_4 \text{H}_2$  concentré + 1 ml d'acide acétique.

- Etuvage : 5 - 10 m. à 90 - 100° C.

6 - Phtalate d'aniline.

Spray : dissoudre 0,93 g d'aniline et 1,66 g d'acide o-phtalique dans 100 ml de 1-butanol saturé d'eau.

Traitement complémentaire : après vaporisation, maintenir le chromatogramme à 105° C pendant 15 minutes.



## CHROMATOGRAPHIE

Support : Kieselgel + 60 ml d'eau distillée

Eluant : Méthyléthylcétone 60

Acide acétique 20

Méthanol 20

LN = lecture en lumière normale.

UV = lecture en lumière ultraviolette.

| Révélateurs            | Solutions lactosées contenant en<br>gamma / mm <sup>3</sup> |    |      |    |      |    |      |    |      |    | Teintes         |                 |
|------------------------|-------------------------------------------------------------|----|------|----|------|----|------|----|------|----|-----------------|-----------------|
|                        | 0,1                                                         |    | 0,08 |    | 0,05 |    | 0,03 |    | 0,01 |    | Taches          | Fond            |
|                        | LN                                                          | UV | LN   | UV | LN   | UV | LN   | UV | LN   | UV |                 |                 |
| N° 4                   |                                                             |    |      |    |      |    |      |    |      |    |                 |                 |
| T T C                  | -                                                           | -  | -    | -  | -    | -  | -    | -  | -    | -  |                 |                 |
| n° 5 a                 |                                                             |    |      |    |      |    |      |    |      |    |                 |                 |
| Anisaldéhyde           | +                                                           | -  | +    | -  | +    | -  | -    | -  | -    | -  | Bleu -<br>mauve | Violet          |
| n° 5 b                 |                                                             |    |      |    |      |    |      |    |      |    |                 |                 |
| Anisaldéhyde           | +                                                           | -  | +    | -  | +    | -  | -    | -  | -    | -  | Bleu -<br>mauve | Violet          |
| n° 5 c                 |                                                             |    |      |    |      |    |      |    |      |    |                 |                 |
| Anisaldéhyde           | +                                                           | -  | +    | -  | +    | -  | -    | -  | -    | -  | Bleu -<br>mauve | Lie du<br>vin   |
| n° 6                   |                                                             |    |      |    |      |    |      |    |      |    |                 |                 |
| Phtalate d'<br>aniline | -                                                           | +  | -    | +  | -    | +  | -    | +  | -    | -  | Brun<br>ambré   | Violet<br>en UV |

TABLEAU N° 4



Le tableau n° 4 résume les résultats obtenus à l'aide des révélateurs n° 4, 5a, 5b, 5c et 6. C'est ce dernier (phtalate d'aniline) qui met le mieux en évidence les quantités les plus faibles de lactose et qui, en conséquence, a été retenu. Il est à préciser que les réactifs 1, 2 et 3 n'ont pas provoqué une réaction visible en lumière normale à la concentration de  $5 \text{ gamma /mm}^3$ .

#### D - Technique adoptée -

L'exposé rendant compte de la technique choisie intégrera les constatations citées antérieurement, directement valables pour une analyse semi-quantitative des sucres d'un lait, et les manipulations matérielles, d'une valeur plus générale, destinées à la mise en main des outils de la technique en question.

##### 1 - Confection des plaques :

Quelque soit la nature du gel utilisé, l'étalement de ce dernier se réalise toujours d'une manière identique. Des plaques en verre de même épaisseur, dont les dimensions varient (  $20 \times 20$ ,  $10 \times 20$ ,  $5 \times 20$  ) selon le nombre de dépôts nécessaires à chaque essai, sont éventuellement dégraissées, lavées, rincées et disposées sur un cadre ; ce gabarit de plastique en maintient en place 5 de  $20 \times 20$ , 10 de  $20 \times 10$  ou 20 de  $20 \times 5$ .

L'étaleur, conçu pour libérer une couche uniforme sur chaque plaque, est alors mis en position à l'extrémité convenable du cadre ; il est bon de le faire jouer deux ou trois fois à vide de façon à assurer de l'alignement correct des plaques. Il est à signaler que l'appareil d'étalement doit démarrer sur une plaque de  $5 \times 20$  et arriver sur une autre identique ; ces deux surfaces servent de "piste" de départ et d'arrivée et sont, en général, inaptes à être utilisées.

Une quantité de 30 g. de Kieselgel "G" est posée puis transvasée dans un mortier propre et sec, où elle est intimement mélangée (absence de grumeaux) à 60 ml d'eau distillée. La durée du malaxage ne doit pas dépasser 3 à 4 minutes de manière à éviter un début de prise dans le mortier même.

La suspension, de consistance liquide, est versée immédiatement dans l'étaleur ; après passage de l'ouverture du réservoir cylindrique de ce dernier de la position haute à la position basse, 30 secondes d'attente environ permettent au gel d'apparaître, en une ligne blanchâtre, sur la plaque de  $5 \times 20$ , dite de départ ; l'étalement est ensuite réalisé ; il doit se faire à une vitesse uniforme que nous avons trouvée devoir être relativement peu rapide ; malgré tout, la réussite d'un étalement parfait, qui se manifeste par un gel d'une épaisseur égale et sans stries, nous semble être essentiellement une question de technique et de mise au point personnelles ; la manette commandant la position de l'ouverture du réservoir de l'étaleur est ensuite passée à nouveau en position haute (position de départ). Il est à noter que des plaques, d'épaisseur légèrement différente, provoquent des stries sur le gel ; il en découle qu'il est préférable d'utiliser des supports en verre d'un même lot.

Ne pratiquant pas l'activation, l'ensemble est laissé à sécher à la température ordinaire ; le laps de temps nécessaire varie naturellement avec l'ambiance ; en général, l'emploi des plaques est possible après attente de 3 - 4 heures.



## 2 - Dépôts :

## a - Préparation des plaques :

Il est bon, de manière à obtenir des résultats permettant des comparaisons, de déposer et de faire migrer selon un schéma bien défini et constant. La ligne de départ de la migration est-elle aussi marquée de touches très légères, faites sans détériorer le gel à l'aide d'un crayon finement taillé, à 1,5 cm d'un bord d'une plaque ; sur l'aire de ces touches se feront les dépôts ; à 10 cm de cette ligne de départ, est tracée une ligne qui sera la limite supérieure du front de migration, 10 cm étant, dans notre cas, une distance convenable d'élution. Toutes ces opérations sont facilitées par l'emploi d'un gabarit en plastique, sur lequel est repéré le tracé permettant une préparation identique de nombreuses plaques.

## b - Quantités déposées :

Les quantités déposées influencent naturellement l'image chromatographique finale ; l'effet de traînée, en particulier, s'accroît souvent lorsque les dépôts apportent des quantités croissantes de sucres. Mais, ici, ce facteur est pratiquement imposé par le sujet de l'étude ; d'une part, en effet, à des solutions étalons contenant respectivement par litre :

## I

|                      |   |                                   |
|----------------------|---|-----------------------------------|
| 0,250 g de glucose   | ) | Solution correspondant à 0,5 g de |
| 0,250 g de galactose | ) | lactose hydrolysé par litre.      |
| 49,500 g de lactose  | ) |                                   |

## II

|                      |   |                                 |
|----------------------|---|---------------------------------|
| 0,500 g de glucose   | ) | Solution correspondant à 1 g de |
| 0,500 g de galactose | ) | lactose hydrolysé par litre.    |
| 49,000 g de lactose  | ) |                                 |

dont nous déposons 1 mm<sup>3</sup>, soit en quantité de sucres :

## I

|                          |
|--------------------------|
| 0,250 gamma de glucose   |
| 0,250 gamma de galactose |
| 49,500 gamma de lactose  |

## II

|                          |
|--------------------------|
| 0,500 gamma de glucose   |
| 0,500 gamma de galactose |
| 49,000 gamma de lactose  |



..... nous comparons un lactosérum officiel (1%). (Ce filtrat est dilué 5 fois par rapport à I et à II ; il est à noter que, pour permettre des comparaisons, il sera nécessaire d'en déposer un volume de 5 mm<sup>3</sup>) ; de plus d'autre part, pour obtenir une lecture du chromatogramme instructive, il faut par litre des solutions étalons I et II les quantités de sucres précitées, car, dans ce cas, la différence de teinte, donnée par les groupes glucose-galactose de I et de II, est sensible (2%), et permet de classer aisément le lait étudié dans une des catégories :

- lactose hydrolysé inférieur à 0,5 g/l
- lactose hydrolysé compris entre 0,5 g/l et 1 g/l, ou égal à l'une de ces valeurs
- lactose hydrolysé supérieur à 1 g/l.

Donc, comme la sensibilité, dans les conditions décrites antérieurement, est suffisante, nous nous tiendrons à ce mode opératoire dans lequel les quantités à chromatographier, donc les volumes à déposer, sont définies par la nature même des choses.

Il est à remarquer que les masses des sucres mises en oeuvre ne représentent pas les quantités optimales, favorables à une bonne résolution, sur le support utilisé (Kieselgel "G" + eau) et dans les conditions jugées les meilleures. Il s'est avéré que la concentration convenable en sucre, c'est-à-dire donnant la plus belle figure chromatographique, est comprise entre 5 gamma et 15 gamma /mm<sup>3</sup> ; c'est aussi celle que nous emploierons ultérieurement, lors de l'étude des conditions d'action d'une lactase commerciale qui n'impose pas des quantités à déposer prédéterminées.

#### (1)\* Remarque :

La migration des sucres sur Kieselgel n'est pas ou pratiquement pas gênée par la présence d'électrolytes provenant des sels de défécation utilisés à dose normale. Il est aussi inutile de procéder à une défécation spéciale à l'acide acétique et à une concentration du filtrat obtenu, comme le conseille Mme RUIZ, pour obtenir la solution à chromatographier. La disproportion des concentrations (solutions étalons et filtrat) sera, dans notre cas, compensée par le dépôt d'un volume plus grand\*, également bien accepté par le gel. Nous verrons, plus loin, que c'est un des avantages de la méthode proposée.

\* de lactosérum

#### (2)\* Remarque :

Pour aboutir aux mêmes résultats, il serait possible de travailler selon la méthode de Mme RUIZ (1) qui ne compare pas, dans ses essais, une reconstitution du lait faite à partir d'un lactosérum, ou un filtrat de lait emprésuré, ou directement le lait lui-même, à des solutions semblables au groupe I et II précité, mais au groupe solution de lactose à 50 g/l (= solution A) et solution identique à I ; la lecture du chromatogramme se fait alors par comparaison avec une absence de teinte (il n'y a pas de glucose et de galactose en A) et une présence (solution I où il y a 0,250 g de glucose et 0,250 g de galactose par litre).

Personnellement, nous préférons travailler avec la présence de deux teintes assez nettement différentes (venant du groupe glucose - galactose de I et de II), ce qui permet à notre oeil d'apprécier mieux si la teinte qu'on



cherche à définir et à classer tire plus vers I ou vers II, ou est inférieure à l'intensité de I ou supérieure à celle de II. Sachant qu'on pourrait encore, en étant exercé, aboutir au même résultat avec l'utilisation de la seule solution I, il est évident que cette technique semi-quantitative, basée sur l'appréciation d'un chromatogramme, est à adapter à sa propre capacité visuelle.

c - Mode de dépôt :

- Considérations générales -

Les dépôts sont réalisés à l'aide d'une micropipette de 10 mm<sup>3</sup>. L'avantage de cet outil est indéniable, car il permet de respecter rigoureusement les proportions des volumes des solutions étalons et du lactosérum, dilué 5 fois par rapport aux premières, qu'il faut faire migrer.

Nous pouvons signaler que le réglage à un niveau déterminé de la pipette se réalise aisément, par capillarité, à l'aide d'un papier absorbant sans fibres superficielles mis en contact plus ou moins longtemps avec l'extrémité inférieure de celle-ci ; de plus, pour un réglage facile, il est conseillé d'éviter les manchons de solution, quelque soit leur taille, pouvant se produire dans la partie supérieure de la pipette.

- Dépôts proprement dits -

La plaque préparée, comme il a été indiqué plus haut, la pipette remplie au niveau désiré (1mm<sup>3</sup> pour les solutions étalons, 5 mm<sup>3</sup> pour le lactosérum de lait), les dépôts sont réalisés par contact très bref sans détérioration du gel, à l'endroit choisi sur le support. Les dépôts doivent être les plus petits possibles ; 1/4 à 1/3 de mm<sup>3</sup> déposé en une seule fois favorise, en général, la qualité du chromatogramme final ; 1/2 mm<sup>3</sup> déposé d'une traite provoque un étalement un peu trop large.

Pour accélérer la manipulation, entre chaque touche l'assèchement du dépôt est réalisable, à l'aide d'un sèche-cheveux ou une toute autre source d'air chaud.

3 - Migration :

a - Préparation de la cuve :

Cette dernière est avantageusement aménagée avant tout ; le temps nécessaire à la mise en forme de la plaque et aux dépôts permettra la saturation de la cuve.

Différents formats de cuve existent :

- Cuves cylindriques de 5,5 x 22 pour les plaques de 5 x 20.

- Cuves cylindriques de 12 x 22 pour les plaques de 10 x 20.

- Cuves parallélépipédiques de 21 x 8,5 x 21 pour les plaques de 20 x 20 ; ces cuves, d'ailleurs, outre une migration unique, permettent de faire migrer, dans les mêmes conditions, des dépôts portés par deux plaques antérieurement fixées à un support en métal ; dans ce cas de migration en commun, il est, en général, intéressant d'utiliser des plaques de 20 x 20 ; néanmoins, les autres formats sont susceptibles d'être employés.



Quelque soit le type de cuve choisi, il est bon que l'enceinte close qu'elle délimite soit saturée de l'éluant adéquat ; après vérification de la propreté de la cuve et ringage avec une certaine quantité du mélange éluant de ses parois internes, un papier absorbant propre (genre papier à chromatographie) est disposé contre sa surface intérieure ; l'emploi de cuves rondes facilite la tenue du papier ; en revanche, les cuves parallélépipédiques impliquent l'utilisation de ruban adhésif, par exemple, destiné à fixer deux rectangles du papier absorbant en question sur ses côtés internes verticaux les plus vastes.

Le mélange éluant déterminé précédemment :

|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| - méthyléthylcétone                      | 60 |
| - acide acétique ( $d = 1,055 - 1,064$ ) | 20 |
| - méthanol                               | 20 |

est alors introduit. Pour faciliter la saturation, il est souhaitable de le faire s'écouler tout d'abord sur le papier, revêtant une partie de la surface intérieure, qui s'en imprègne intégralement. La hauteur, au fond de la cuve, du mélange éluant, doit être de  $\frac{1}{2}$  cm environ ; elle est, en général, atteinte avec un volume approximatif de :

- 100 ml pour les cuves parallélépipédiques.
- 70 ml pour les cuves cylindriques de 12 x 22.
- 25 ml pour les cuves cylindriques de 5,5 x 22.

La cuve ainsi préparée est fermée à l'aide de son couvercle surmonté d'un poids (rond ou plaquette en plomb, par exemple, pour éviter l'action d'une surpression interne éventuelle), et laissée en attente durant le laps de temps nécessaire aux manipulations précédant la migration proprement dite.

b - Migration proprement dite :

Les dépôts étant réalisés, si un sèche-cheveux a été utilisé, la plaque est inégalement tiède ; attendre qu'elle refroidisse (5 - 10 m.), de manière à obtenir un front horizontal. Porter ensuite la plaque dans la cuve de migration ; il est bon de l'y introduire bien verticalement, et de la faire ensuite reposer délicatement, quand nous opérons une migration unique par cuve, contre les parois de celle-ci, du côté de la face ne supportant pas le gel de silice (le "pied" de la plaque, dans le cas d'emploi de cuve parallélépipédique, peut-être maintenu en place par deux lamelles de verre mises au fond de la cuve) ; couvercle et poids en plomb sont ensuite remis en place. La migration proprement dite se déroule alors et dure, en moyenne, selon les conditions, de 20 à 25 m.

#### 4 - Révélation -

a - Séchage préliminaire de la plaque :

Lorsque le front de migration est arrivé à la hauteur désirée, la plaque est retirée avec précaution de la cuve et déposée sur un support horizontal, devant l'ouverture du sèche-cheveux qui lui enverra indirectement un souffle d'air chaud favorisant l'évaporation de l'éluant imbibant le



gel de silice ; l'emploi de l'appareil pulsant de l'air chaud n'est pas nécessaire, mais raccourcit le temps de séchage.

#### b - Aspersion :

Elle s'exécute à l'aide d'un pulvérisateur en verre contenant du réactif au phtalate d'aniline fraîchement préparé ( ce révélateur se conserve peu de temps : au maximum huit jours ; sa conservation est améliorée par maintien à l'obscurité) ; un compresseur fournira, beaucoup plus aisément qu'une poire, la pression nécessaire à une pulvérisation régulière. L'aspersion doit être uniforme, bien répartie ; elle est facilitée lorsque la plaque est en position sub-v verticale ; il faut prendre garde à ne pas asperger trop abondamment, car le gel, devenu humide, aurait alors tendance à se déplacer quelque peu vers le bas, et à détériorer ainsi la figure chromatographique finale ; beaucoup d'accidents, imputés à priori à une migration défectueuse, sont, en fait, à mettre au compte d'une aspersion excessive.

#### c - Etuvage :

Aussitôt l'aspersion réalisée, la plaque est déposée dans une étuve à 105° C pendant 15 minutes. C'est pendant ce temps d'étuvage qu'à lieu l'apparition des taches marquant la position des différents sucres étudiés.

### 5 - Lecture du chromatogramme :

#### a - Lecture en lumière normale :

Dans notre cas précis, la lecture en lumière normale est possible ; la tache, relative au lactose des solutions étalons et du lactosérum, est nettement visible (teinte brune ; après 24 h : teinte brune légèrement fournie de vert) ; vu l'importance de la quantité présente de ce sucre, un effet de traînée est provoqué ; en revanche, les taches relatives aux galactose et glucose des mêmes solutions (teinte brune sans variation) et repérées, dans cet ordre, plus près de la ligne d'arrivée du front de migration, sont dépourvues de l'effet précité. Il est à noter qu'en lumière normale seulement, à condition que les plaques soient conservées à l'obscurité, la lecture est plus aisée, c'est-à-dire que les taches sont plus nettes, mieux délimitées, après 24 à 48 h. environ.

#### b - Lecture en lumière ultraviolette :

Mis sous une lampe produisant une lumière ultraviolette de longueur d'onde 350 m $\mu$ , le chromatogramme présente des taches brunes (brun ambré foncé au centre et ambré clair sur le pourtour ou brun blanchâtre, selon la concentration) correspondant aux différents sucres, sur un fond violet appuyé ; des taches à peine perceptibles, et même imperceptibles, en lumière normale, deviennent visibles en UV. C'est dans ces conditions que les taches blanchâtres données par 0,250 gamma /mm<sup>3</sup> de glucose + 0,250 gamma par mm<sup>3</sup> de galactose sont assez nettement différentes de celles blanchâtres également données par 0,500 gamma par mm<sup>3</sup> de galactose + 0,500 gamma par mm<sup>3</sup> de glucose des solutions étalons I et II ; c'est aussi dans ces conditions que le spot, plus ou moins bi-parties, provoqué par le groupe glucose + galactose éventuellement présents dans un filtrat peut-être aisément comparé au spot bi-parties fourni par le groupe des mêmes sucres des solutions I et II.



### III - RESULTATS

#### A - Résumé du but poursuivi :

La présence de 0,5 g ou plus de lactose hydrolysé par litre de lait implique, consécutivement à la démonstration de Mme I. SAENZ LASCANO RUIZ (1), la nécessité de procéder à une hydrolyse complète du lactose avant son dosage. Le but de notre étude est donc, comme nous l'avons signalé au départ, de mettre facilement et rapidement en évidence cette présence éventuelle de 0,5 g de diholoside hydrolysé à l'aide de la technique de chromatographie en couches minces, dont nous avons vu la détermination des conditions d'emploi, beaucoup plus véloce que la technique de chromatographie sur papier.

#### B - Résumé du principe :

Le filtrat ou lactosérum du lait mis sous-analyse migrera parallèlement à des solutions étalons de sucres contenant respectivement :

- 0,250 g de glucose + 0,250 g de galactose (équivalents à 0,5 g de lactose hydrolysé) + 49,5 g de lactose par litre.
- 0,500 g de glucose + 0,500 g de galactose (équivalents à 1 g de lactose hydrolysé) + 49 g de lactose par litre.

Après révélation, les intensités des teintes des taches correspondant aux hexoses seront comparées, cette comparaison permettant de conclure si le lait étudié contient plus ou moins de 0,5 g de lactose hydrolysé par litre de lait.

#### C - Protocole de l'analyse :

##### 1 - Obtention du filtrat :

##### a - Matériel et réactifs nécessaires :

- un ballon jaugé de 200 ml.
- solution aqueuse de ferrocyanure de potassium  $\text{Fe}(\text{CN})_6 \text{K}_4$ , 3  $\text{H}_2\text{O}$  à 15 % (solution A).
- solution aqueuse d'acétate de zinc  $(\text{CH}_3 \text{COO})_2 \text{Zn}$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$  à 30 % (solution B).
- phénolphthaleïne en solution alcoolique à 0,5 % (solution C).
- liqueur alcaline normale de potasse KOH (solution D).
- solution de chlorure de baryum à 5 % (solution E).

##### b - Obtention proprement dite :

##### Cas des laits normaux ou formolés :

Dans une fiole jaugée de 200 ml mettre 40 ml exactement mesurés de lait correctement homogénéisé (1\*), puis :

- cinquante ml environ d'eau distillée. Agiter.
- 8 ml de ferrocyanure de potassium (A). Agiter.
- 8 ml d'acétate de zinc (B). Agiter.



- 2 gouttes de phénolphtaléine (C). Agiter.
- Eventuellement, de manière à rincer le col du ballon, 5 - 10 ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette.
- Neutraliser ensuite, en agitant, jusqu'à teinte légèrement rose à l'aide de la solution de potasse (D).
- Compléter au trait de jauge, et ajouter à la pipette 4 ml d'eau distillée de manière à compenser le volume du coagulum. Mélanger soigneusement.
- Attendre 10 minutes environ.
- Filtrer sur filtre sec. Le filtrat doit être limpide ; il est parfois légèrement rose ce qui ne perturbe nullement les dosages ultérieurs.

#### Cas des laits bichromatés :

L'élimination du bichromate est nécessaire ; procéder alors ainsi :

- mettre avec précision dans une fiole jaugée de 200 ml, 40 ml de lait préalablement homogénéisé (1%).
- cinquante ml environ d'eau distillée. Agiter.
- 8 ml de ferrocyanure de potassium (A). Agiter.
- 8 ml d'acétate de zinc (B). Agiter.
- 2 gouttes de phénolphtaléine (C). Agiter.
- Rincer éventuellement le col du ballon avec 5 - 10 ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette.
- Attendre deux minutes.
- Neutraliser, en agitant, à l'aide de la solution normale de potasse (D) ; après obtention d'une teinte rosée, ajouter encore 1 ml de la liqueur alcaline. Agiter. Le contenu de la fiole acquiert une teinte franchement rose.
- Rincer éventuellement le col du ballon avec une petite quantité d'eau distillée.
- Attendre 5 minutes environ.
- Ajouter 20 ml de la solution de chlorure de baryum (E). Agiter.
- Attendre 10 à 15 minutes.
- Ajuster au trait de jauge, compléter à 204 ml et agiter.
- Laisser reposer quelques instants et filtrer sur filtre sec ; le filtrat obtenu est limpide mais plus ou moins rose, ce qui ne gêne également pas les dosages ultérieurs.



## (1)\* Remarque :

Une homogénéisation correcte, dans le cas de laits altérés, est obtenue à l'aide de l'appareil mis au point par Mme MARTELLI et NAVELLIER (15).

## 2 - Chromatographie :

## a - Réactifs nécessaires :

## I Solution étalon de :

|                     |                 |
|---------------------|-----------------|
| - Lactose hydraté : | 49,500 g        |
| - Glucose :         | 0,250 g         |
| - Galactose :       | 0,250 g         |
| - Eau distillée :   | q.s.p. 1.000 ml |

Cette solution correspond à une teneur en lactose hydrolysé de 0,5 g/l.

## II Solution étalon de :

|                     |                 |
|---------------------|-----------------|
| - Lactose hydraté : | 49,000 g        |
| - Glucose :         | 0,500 g         |
| - Galactose :       | 0,500 g         |
| - Eau distillée :   | q.s.p. 1.000 ml |

Cette solution correspond à une teneur en lactose hydrolysé de 1 g/l.

## III Eluant :

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| - Méthyléthylcétone                  | 60 volumes |
| - Acide acétique (d = 1,055 - 1,064) | 20 volumes |
| - Méthanol                           | 20 volumes |

## IV Révélateur au phtalate d'aniline :

|                                        |                                              |
|----------------------------------------|----------------------------------------------|
| - Aniline fraîchement distillée        | 930 mg (soit un volume voisin de 9/10 de ml) |
| - Acide orthophtalique                 | 1,660 g                                      |
| - Alcool butylique normal saturé d'eau | 100 ml.                                      |

## b - Mode opératoire basé sur un exemple :

Le mode opératoire sera décrit plus aisément à l'aide d'un exemple dans lequel seront comparés les lactosérums de trois laits ; ce cas particulier impose, pour une raison de pratique, l'emploi d'une catégorie de matériel de chromatographie définie (cuve ronde de 12 x 22 avec utilisation de plaques de 10 x 20). Ce sont les manipulations nécessaires à la réalisation de cet essai qui seront indiquées ; cependant, hormis cette particularité de l'exemple, il est évident qu'un essai identique, mais portant sur un nombre différent de laits, serait conduit selon un même schéma en substituant simplement au matériel convenable pour notre cas, du matériel adéquat pour l'essai désiré.



Il est à signaler que le filtrat des laits a été obtenu comme il est indiqué précédemment. Les laits étudiés sont :

- LN : lait de consommation pasteurisé, acheté en bouteille capsulée, datant de deux à trois jours.
- LB : lait cru bichromaté (0,250 g de bichromate pour 250 ml), âgé de 4 mois  $\frac{1}{2}$ . L'antiseptique a été ajouté environ 3 heures après la traite.
- LF : lait cru formolé (2 gouttes de formol + 0,5 g de trioxyméthylène pour 250 ml).

Cet échantillon a la même origine que le lait bichromaté (4 mois  $\frac{1}{2}$ ). L'antiseptique a également été ajouté 3 heures environ après la traite.

Les laits LB et LF présentaient les caractères de laits fortement altérés ; en particulier, le lait bichromaté avait acquis, au cours du stockage, une teinte verdâtre caractéristique de la réduction du bichromate.

- Préparation de la cuve (voir II-D - 3 - a).
- Préparation de la plaque (voir II-D - 2 - a).

Choisir une plaque de 10 x 20 recouverte d'une pellicule de gel sans défauts (pour la confection des plaques voir II-D - 1). Porter sur ce dernier, à 1,5 cm d'une des largeurs de la plaque, 9 touches très légères. Faire en sorte que les deux touches extrêmes soient chacune à 1 cm des longueurs du support en verre et que les 9 marques soient équidistantes entre elles de 1 cm. L'ensemble des 9 affleurements matérialise la ligne de départ de la migration ; tracer à 10 cm de cette dernière la ligne d'arrivée du front de l'éluant, où seront nettement repérées, vers l'extrémité supérieure de la plaque, neuf positions dont chacune mentionnera la nature du dépôt opéré sur la touche correspondante ; dans notre cas, cela se traduit par le soulignement des 9 points suivants (voir la photographie n° 1) :

- 0,5 : marquant la situation du dépôt de la solution correspondant à une teneur en lactose hydrolysé de 0,5 g/l.
- LN : marquant la situation du dépôt du filtrat du lait pasteurisé non additionné d'antiseptique.
- 1 : marquant la situation du dépôt de la solution correspondant à une teneur en lactose hydrolysé de 1 g/l.
- 0,5 : -
- LB : marquant la situation du dépôt du filtrat du lait additionné de bichromate.
- 1 : -
- 0,5 : -
- LF : marquant la situation du dépôt du filtrat du lait additionné de formol.
- 1 : -



- Dépôts (voir II-D - 2 - c) :

A l'aide de la pipette calibrée, déposer successivement (voir II-D -2 - b, relatif aux quantités déposées) sur les touches marquant la ligne de départ :

1 mm<sup>3</sup> de la solution I.

5 mm<sup>3</sup> du filtrat du lait LN.

1 mm<sup>3</sup> de la solution II.

1 mm<sup>3</sup> de la solution I.

5 mm<sup>3</sup> du filtrat du lait LB.

1 mm<sup>3</sup> de la solution II.

1 mm<sup>3</sup> de la solution I.

5 mm<sup>3</sup> du filtrat du lait LF.

1 mm<sup>3</sup> de la solution II.

- Migration (voir II-D - 3 - b) :

Introduire la plaque dans la cuve en évitant que ses bords ne touchent, en position finale, la feuille de papier absorbant imprégnée d'éluant.

3 - Résultats :

Les résultats se déduisent de la lecture du chromatogramme (voir II-D-2-b remarque 2 et II-D-5- a et b relatifs à la lecture des chromatogrammes). Nous opérons cette lecture en lumière normale et en lumière ultra-violette.

a - Lecture en lumière normale (voir la photographie n° 1, réalisée en lumière normale artificielle sur film Isopan IFF, diaphragme 9, pose 1/20 de seconde).

- Perception du spot des hexoses de la solution "0,5" :

Dans ces conditions d'éclairement, le spot est à la limite de la visibilité ; pour permettre de conclure valablement, dans cet état de choses, il serait nécessaire que la tache fournie par les hexoses éventuels d'un filtrat de lait ne soit pas visible ou, au contraire, assez nettement déterminée.

- Perception du spot des hexoses de la solution "1" :

Le spot est visible en lumière normale. Son intérêt est d'aider à situer la tache donnée par les hexoses d'un lactosérum.



### - Conclusions :

En lumière normale, les taches correspondant aux hexoses des solutions étalons I et II possèdent des intensités différentes ; il serait possible de conclure en leur comparant le spot fourni par le groupe glucose-galactose d'un filtrat de lait analysé ; mais, dans le cas où la solution I et le filtrat de lait provoqueraient des taches, correspondant aux hexoses, d'intensité voisine, une limite à une lecture instructive de la chromatoplaque se révélerait. Dans cette éventualité, alors que normalement elle est souhaitable, la lecture en lumière ultraviolette s'imposerait.

- b - Lecture en lumière ultraviolette (voir la photographie n° 2, prise en UV, de longueur d'onde 350 mμ ; sur film Isopan IFF, diaphragme 5, pose 1/4 de seconde : cette photographie représente la même chromatoplaque que la photographie n° 1) :

Les différences de teinte s'accroissent et facilitent, en conséquence, la lecture.

### - Perception du spot des hexoses de la solution "0,5" :

Le spot blanchâtre se détache nettement sur un fond violet ; la comparaison de l'intensité d'une autre tache à son intensité est plus facilement réalisable.

### - Perception du spot des hexoses de la solution "1" :

Le spot est blanc ; il permet, sous cet éclairage de situer encore plus aisément, au point de vue intensité, la tache éventuelle des hexoses d'un lactosérum.

### - Conclusions :

L'intensité d'un spot provoqué par les hexoses possibles d'un lait est, en UV, plus aisément comparable à celle des taches fournies par l'ensemble glucose - galactose des solutions étalons I et II et, de ce fait, permet de classer facilement le lait en cause dans une des catégories :

Catégorie I : lait dont le lactose est hydrolysé à un taux inférieur à 0,5 g/l.

Catégorie II: lait dont le lactose est hydrolysé à un taux compris entre 0,5 g et 1 g/l, ou égal à l'une de ces deux valeurs.

Catégorie III: lait dont le lactose est hydrolysé à un taux supérieur à 1 g/l.

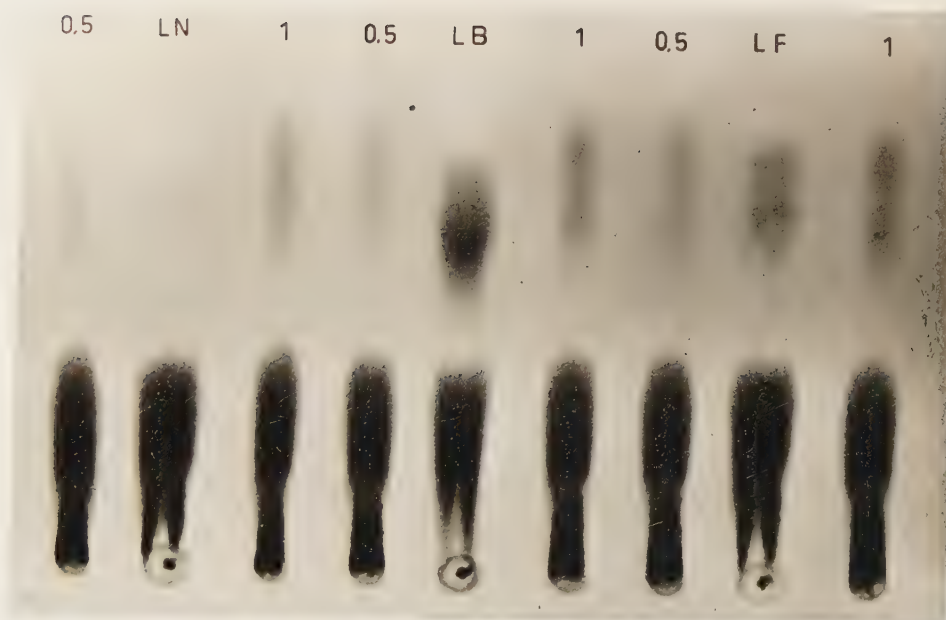
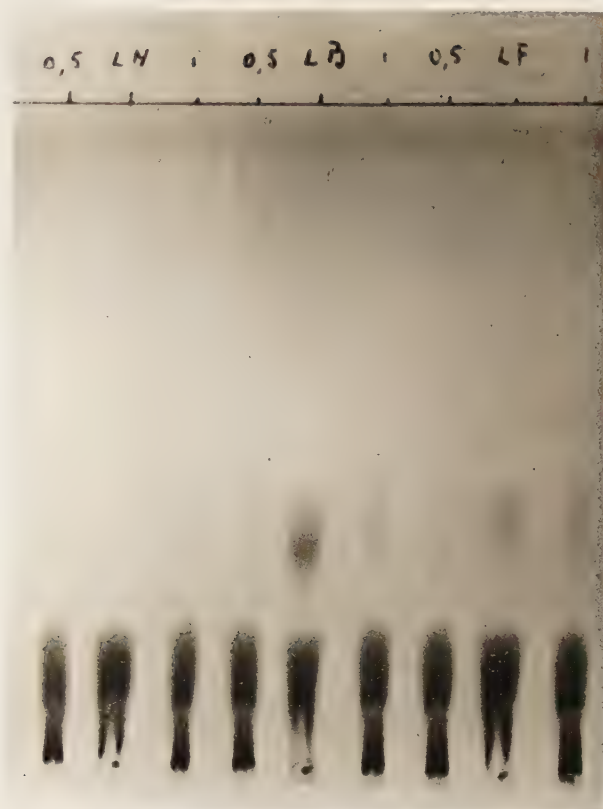
### c - Conclusions propres à notre essai :

En lumière normale ou en lumière ultra-violette, mais de préférence sous ce dernier éclairage où elle est plus aisée et plus nette (comparer les photographies n° 1 et n° 2), la lecture du chromatogramme montre :



PHOTOGRAPHIE N° 1 :

identification des sucres  
dans le filtrat de 3 laits  
(chromatoplaque exposée  
à de la lumière normale  
artificielle.)



PHOTOGRAPHIE N° 2 : identification des sucres dans le filtrat de 3 laits (chromatoplaque exposée aux U. V.)



- que le lait LN, lait pasteurisé âgé de 2 à 3 jours, entre dans la catégorie I.
- que le lait LB, lait bichromaté âgé de 4 mois  $\frac{1}{2}$ , contient nettement plus de 1 g de lactose hydrolysé par litre (catégorie III).
- que le lait LF, lait formolé âgé de 4 mois  $\frac{1}{2}$ , contient un peu plus de 1 g de lactose hydrolysé par litre (catégorie III).

En conséquence, si nous devons doser par réductimétrie le lactose dans les trois laits précédents, il serait nécessaire de procéder à l'hydrolyse totale préalable du diholoside du lactosérum des laits LB et LF.

#### IV - CONCLUSION GENERALE -

Le but de notre analyse était de mettre en évidence, à l'aide de la technique de chromatographie en couches minces, si, dans un lait, il y avait éventuellement présence de glucose et de galactose en quantité totale inférieure, égale ou supérieure à 0,5 g/l, correspondant à une teneur en lactose hydrolysé de 0,5 g/l. Ayant déterminé et groupé en un schéma opératoire les conditions d'expérimentation favorables à notre cas particulier, nous avons vu, à l'aide d'un exemple, qu'il était possible de réaliser cette détermination. Mais la méthode décrite par Mme RUIZ (1), utilisant la chromatographie sur papier, permet également cette détermination ; quels sont donc les avantages possibles de la chromatographie en couches minces comparée à la chromatographie sur papier dans le cas qui nous intéresse ?

Après avoir brièvement rappelé la technique de l'auteur précité, nous conclurons quant aux améliorations éventuelles apportées par notre technique.

##### 1 - Technique de Mme RUIZ (1 - 2) :

###### a - Produits nécessaires :

- Acide acétique à 2°/100
- Eluant :
 

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| Alcool butylique normal | 40 volumes. |
| Acide acétique          | 10 volumes. |
| Eau distillée           | 50 volumes. |

Agiter vivement et laisser décantier ; séparer la phase aqueuse (E<sub>1</sub>) de la phase organique (E<sub>2</sub>).

- Révélateur au phtalate d'aniline (voir II C).
- Solution I étalon de lactose - glucose - galactose (voir II-D - 2 - b).
- Solution II étalon des mêmes sucres (voir II - D - 2 - b).
- Solution III étalon de lactose (50 g/l).



### b - Matériel de chromatographie :

- cuve à chromatographie descendante.
- papier d'Arches 302 ou Whatmann n° 2 ou n° 4.

### c - Obtention de la solution à chromatographier :

Les électrolytes présents, a noté l'auteur, n'influencent pas la séparation du lactose d'avec le glucose et le galactose. Mais, la technique de chromatographie sur papier étant utilisée, il est nécessaire de ne pas charger la solution à chromatographier en électrolytes ayant pour origine les sels de défécation ; les dépôts seront aussi réalisés à l'aide :

I du lactosérum provenant d'une défécation à l'acide acétique à 2°/oo.

II ou du filtrat provenant d'une coagulation de la caséine par la présure.

III ou du lait mis sous analyse lui-même.

Les méthodes II et III ne donnent pas de beaux chromatogrammes car la présence de protéines perturbe la migration des sucres ; en revanche, la première procure de plus belles figures chromatographiques, mais implique, selon le procédé de l'auteur, la concentration du lactosérum dilué dix fois au cours de la défécation acétique, de façon à rétablir, dans la solution qui migrera, la teneur en lactose du lait d'origine.

### d - Chromatographie :

#### - Préparation de la feuille de papier :

Elle se résume à la préparation matérielle courante du support en chromatographie sur papier.

Aux différents points de dépôt définis lors de cette préparation, sont mises à l'aide de la même pipette Pasteur :

- 1 microgoutte de la solution III.
- 1 microgoutte de la solution I.
- 1 microgoutte de la solution II.
- 1 microgoutte du filtrat concentré, du lait déféqué à l'acide acétique.

#### - Préparation de la cuve :

Placer l'éluant E<sub>1</sub> dans le fond de la cuve, puis y suspendre la feuille. Boucher hermétiquement et laisser se réaliser la saturation (24 h.). Si une grosse cuve est employée, il est bon d'en saturer au préalable l'atmosphère pendant 24 h. Introduire ensuite, par un orifice idoine, la phase E<sub>2</sub>.

#### - Migration :

Sitôt E<sub>2</sub> introduit, elle se déroule. L'utilisation du papier Whatmann n° 4 permet la séparation du lactose d'avec le glucose et le galactose en une quinzaine d'heures ; le papier Arches 302 permet la séparation du glucose d'avec le galactose en une cinquantaine d'heures.



## - Révélation ; lecture du chromatogramme :

Ces deux phases se déroulent selon un schéma identique à celui décrit en II - D - 4 et 5.

## 2 - Comparaison de la méthode de Mme RUIZ et de la méthode proposée :

Cette comparaison se ramène essentiellement à dégager les différences existant entre les techniques de chromatographie sur papier et en couches minces.

### a - Différences au point de vue rapidité de manipulation :

En chromatographie sur papier la durée totale nécessaire à l'obtention du résultat recherché est d'une quarantaine d'heures en employant un papier rapide (Whatmann n° 4) et de quatre-vingts heures environ en utilisant un papier plus lent (Arches 302). En revanche, l'ensemble de la manipulation, en couches minces, ne nécessite qu'un délai de 2 h environ pour obtenir les indications indispensables à la poursuite du dosage du lactose dans le lait mis en oeuvre.

### b - Simplification des manipulations :

La chromatographie sur papier supporte difficilement la présence d'électrolytes dans le filtrat qui migrera ; il est aussi nécessaire de pratiquer une défécation spéciale à la détermination semi-quantitative des sucres d'un lait, et préalable au dosage du lactose réalisé sur un lactosérum issu d'une défécation officielle. En outre, l'enceinte doit être maintenue à une température constante ce qui nécessite une ambiance thermostatée.

En chromatographie en couches minces, il n'est pas indispensable d'opérer la défécation à l'acide acétique, car le gel utilisé supporte la présence d'électrolytes en quantité déterminée par une défécation courante au ferrocyanure de potassium et à l'acétate de zinc, et, éventuellement, dans le cas des laits bichromatés, au chlorure de baryum. De plus, la reconcentration du lactosérum de cette défécation, dilué ici cinq fois par rapport au lait d'origine et aux solutions étalons de sucres, n'est pas une condition primordiale pour obtenir des chromatogrammes corrects, car cette différence de concentration est corrigée, comme nous l'avons<sup>3</sup> indiqué, par le dépôt de 1 mm<sup>3</sup> des solutions de référence et de 5 mm<sup>3</sup> du filtrat, de tels dépôts étant acceptés par le support utilisé. En outre, la chromatographie peut se dérouler à la température ambiante et subir sans dommage ses petites variations.

L'avantage est intéressant dans la mesure où un chromatogramme d'un lactosérum, obtenu par la méthode officielle, révèle, après environ seulement deux heures d'attente, si le lait mis en oeuvre contient ou non 0,5 g de lactose hydrolysé par litre, et dans la mesure où le dosage du lactose pourra être entrepris, après hydrolyse totale ou non, la réponse à l'alternative étant fournie par la lecture du chromatogramme, sur le même filtrat officiel qui a été mis en réserve ; en outre, sur le même lactosérum encore, peut-être réalisée la détermination de la teneur en chlorures, éventuellement conjointe à une autre détermination en chlorures à l'aide de la technique de l'attaque nitro-permanganique employée au Laboratoire Municipal de Paris.



### 3 - Limites de la méthode :

Comme en chromatographie sur papier, l'exploitation des résultats fournis par une détection semi-quantitative des sucres d'un lait à l'aide de la technique de chromatographie en couches minces, n'est profitable que dans la mesure où seule la fermentation lactique s'est plus ou moins développée dans le lait en question ; dans l'éventualité d'autres fermentations, facilement décelables, il est souhaitable de mettre en oeuvre d'autres techniques, ou encore, en cas d'altération profonde, de ne pas entreprendre la recherche de la teneur en lactose, à coup sûr aberrante, et d'essayer alors de définir le lait sous-analyse à l'aide d'autres éléments moins dégradés.



## C H A P I T R E I I

### ESSAI d'HYDROLYSE TOTALE du LACTOSE dans un LAIT par ACTION d'une LACTASE COMMERCIALE.

Lorsqu'il a été déterminé, à l'aide de la méthode proposée décrite en première Partie, qu'un lait contient plus de 0,5 g de lactose hydrolysé par litre de lait, il est nécessaire de pratiquer l'hydrolyse totale du disaccharide, condition "sine qua non" à l'obtention de résultats corrects. Cette hydrolyse est actuellement réalisée par voie chimique selon la technique que Mme RUIZ (1 - 2) a élaborée. Or, cette technique, nous le verrons plus loin, comporte un assez grand nombre de manipulations et implique, en outre, une hydrolyse du lactose dont la durée est de 4 heures pour être totale ; la nécessité, nous le rappelons, que la donnée, fournie par le dosage de la teneur en lactose d'un lait, soit valable, exige le respect du schéma opératoire décrit par l'auteur cité antérieurement. Mais, n'est-il pas permis de songer qu'il pourrait exister une voie plus courte et moins complexe ? C'est ce que nous avons essayé de déterminer au cours de l'essai rapporté dans les pages qui viennent.

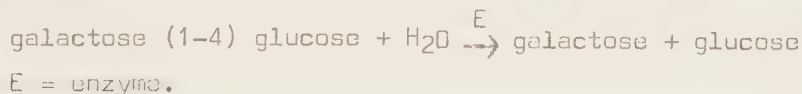
#### I - PRINCIPE -

##### 1 - Base du principe :

Certaines hydrolyses, réalisées en présence de biocatalyseurs, se déroulent, en l'absence d'inhibiteurs, totalement, lorsque l'un des produits qui se dégrade domine fortement dans le milieu au point de vue concentration. Ce précepte est confirmé dans la littérature en particulier par FLORKIN qui, citant en exemple l'invertase, hydrolase bien connue, enseigne (5) :

"Bien que, théoriquement, les enzymes hydrolysant les liaisons osidiques soient capables de catalyser la liaison inverse de synthèse, cette dernière n'est pas à considérer en fait"... (car en solution aqueuse) ..." l'une des substances intervenant dans la réaction, l'eau, à une concentration énormément prédominante et la réaction d'hydrolyse est en pratique irréversible".

Or, la lactase ou Bêta-galactosidase est, comme l'invertase, une hydrolase, et l'affirmation précédente peut, à priori, lui être éventuellement appliquée. Son grand intérêt serait, dans notre cas, de faciliter peut-être une hydrolyse totale et rapide du lactose en solution aqueuse (cas du lait), en permettant, en plus, de simplifier accessoirement les manipulations. L'hypothèse d'une hydrolyse totale du lactose en solution aqueuse est confirmée par COURTOIS (6) qui précise que, lorsque l'accepteur est l'eau, la lactase rend possible la réaction :



##### 2 - Objections possibles :

###### - Réactions du transfert :

Les travaux de WALLenfELS (7 - 8 - 17) et de PAZUR (9 - 10), cités par POMERANZ (11), ont mis en évidence, outre l'action hydrolysante de la lactase, une action transférante avec production d'oligosides ; or, la présence de ces sucres néoformés pourrait modifier le pouvoir réducteur



de l'ensemble et permettre d'emblée de songer que le dosage réductimétrique du lactose hydrolysé, effectué ultérieurement, serait erroné. Mais WALLENFELS, COURTOIS précisent encore que le contact prolongé substrat-enzyme aboutit à la destruction des oligosides formés pour redonner du glucose et du galactose. De plus, d'après WÖHNLICH (12), les lactases des plantes (la lactase utilisée dans nos essais a pour origine la levure), sans autres précisions, auraient fort peu ou pas de pouvoir transférant.

En conséquence, cette objection n'altère pas fondamentalement, à priori, le principe de base, et ne permet pas, dès le départ, de conclure que des essais, fondés sur le principe en question, fourniront, à coup sûr, des résultats inutilisables, en particulier, si une éventuelle modification du pouvoir réducteur du mélange : galactose + glucose + de possibles oligosides ne modifie pas finalement le dosage de plus de 0,2 g/l qui est l'erreur tolérée.

#### - Présence de conservateurs dans le lait :

Une autre objection à l'application du principe de base à notre cas particulier est la présence dans les laits altérés, pour lesquels, le plus souvent, une hydrolyse totale du lactose est nécessaire, de bichromate de potassium ou de formol auquel est adjoint une pastille de trioxyméthylène. Mais, on ne peut affirmer, ex abrupto, que ces corps étrangers sont fatalement néfastes au déroulement d'une action enzymatique convenable, surtout lorsque l'on sait, par REITHEL (13) et CAPUTTO (14), par exemple, que les ions potassium favorisent l'action de certaines lactases sur le lactose.

### 3 - Conclusion : Schéma opératoire adopté :

Le schéma opératoire sera basé sur la possibilité que le principe énoncé en Ch.II-I est applicable à notre cas. Après avoir déterminé les conditions d'action optima d'une Bêta-galactosidase commerciale, faite, selon le laboratoire fournisseur\*, à partir de levure, il sera réalisé différents essais dont chacun comportera l'hydrolyse totale du lactose d'un lait, par voie chimique, selon la technique de Mme RUIZ (1 - 2), et espérée totale, par voie enzymatique ; les résultats fournis par les deux méthodes seront ensuite comparés.

## II - DETERMINATION DES CONDITIONS d'ACTION, SUPPOSEES les MEILLEURES, d'une LACTASE COMMERCIALE :

### A - Principe.

Après avoir, à une certaine température, mis en contact lactose en solution aqueuse et enzyme en suspension dans un tampon de pH défini, chaque élément de l'ensemble étant déterminé par nos soins, il est fait des prélèvements à intervalles réguliers, fournissant des échantillons où l'hydrolyse en cours est stoppée immédiatement ; chaque échantillon est ensuite l'origine d'un dépôt, de volume défini, sur une plaque de Kieselgel qui sera soumise à la technique de chromatographie des sucres, en couches minces, décrite en première Partie. Après révélation, il est possible de repérer sur la

\* Produit obtenu auprès des laboratoires EUROBIO, 20 Bd St-Germain PARIS V°.



plaque la disparition progressive du lactose, correspondant à une apparition progressive des spots marquant la position des glucose et galactose ; l'instant, facilement saisissable en lumière ultraviolette, à partir duquel le lactose n'est plus perceptible, marquera, pour nous, le moment où l'hydrolyse peut être considérée comme complète ; cet instant, bien noté dans chaque essai, variera évidemment en fonction des conditions d'hydrolyse, puisque ces dernières modifient le cours de la dégradation glucidique ; son repérage permettra ainsi de déceler l'action, retardatrice ou activante de l'évolution de l'hydrolyse, de modifications éventuelles portant sur des facteurs agissant sur la scission du lactose ; les agents modifiant la vitesse d'hydrolyse, exprimée ici en minutes, pourront ainsi être comparés et sélectionnés en fonction de leur aptitude à faire évoluer cette dernière dans le sens qui nous intéresse, c'est-à-dire dans l'optique d'une hydrolyse désirée rapide du diholoside. Les facteurs, pouvant agir sur la rapidité de la dégradation osidique, sont essentiellement :

- la concentration initiale en lactose.
- la concentration en enzyme.
- la nature des sels constituant le tampon.
- la force ionique du tampon.
- le pH du tampon.
- la température d'hydrolyse.
- des activateurs ou inhibiteurs éventuels.

La concentration en lactose du mélange : sucre en solution aqueuse + enzyme en suspension dans le tampon est choisie arbitrairement : elle correspond à une teneur de 1 % qui, lors du dépôt, facilement réalisable, de 1 mm<sup>3</sup>, soit 10 gamma, en poids de sucres totaux avant ou après hydrolyse, permet l'obtention de chromatogrammes acceptables sans effet de traînée accentué.

De plus, certains auteurs (13 - 14) signalant l'action favorable des ions potassium, nous avons choisi un tampon à base de PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> et de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K.

Finalement, après avoir décrit la technique d'hydrolyse conduisant à la donnée recherchée, nous conclurons en confrontant les résultats fournis par les variations conscientes des cinq facteurs : concentration en enzyme, force ionique du tampon, pH du tampon, température, activateurs possibles, et en signalant quelles sont, sur nos bases de travail, les conditions d'une action optima de la lactase commerciale mise à notre disposition.

## B - Technique.

### 1 - Matériel nécessaire :

#### a - Matériel d'hydrolyse

- un bain-marie ordinaire à température portable à 100° C.
- une balance de précision ( $\pm$  0,5 mg).
- un homogénéisateur.
- un chronomètre.
- un bain-marie à température réglable ( $\pm$  0,5° C).



- un ballon non jaugé de 100 ml, muni d'un bouchon adapté en caoutchouc parexemple.
- environ vingt pipettes de 1 ml, permettant un pipettage aisé.
- environ vingt tubes à essais d'un cm de diamètre avec portoirs adéquats.
- quelques pipettes de précision de 20 ml et de 15 ml.
- un bécher de 30 ml.

b - Matériel de chromatographie :

La technique utilisée est la technique de chromatographie en couches minces. Le matériel nécessaire est donc identique à celui décrit en première Partie ; mais, vu le grand nombre de dépôts à réaliser, il est souhaitable d'utiliser des plaques de 20 x 20 cm et les cuves de chromatographie adéquates.

2 - Réactifs nécessaires :

a - Réactifs d'hydrolyse :

- Enzyme = Bêta-galactosidase dite "de levure", en provenance d'un laboratoire spécialisé.\*
- Solution de lactose à 2 % (la concentration est double de celle désirée dans le mélange enzyme-substrat).
- Tampon phosphate ( $\text{PO}_4\text{HK}_2 + \text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ) de force ionique et de pH idoines (la force ionique est double de celle désirée dans le mélange enzyme-substrat).
- Solution saturée de  $\text{SO}_4\text{CU}$ .

b - Réactifs de chromatographie :

Migration et révélation sont conduites de la même manière que lors du dosage semi-quantitatif des sucres d'un lait (première Partie), à l'aide de la technique de chromatographie en couches minces ; les réactifs nécessaires sont, en conséquence, les mêmes.

3 - Mode opératoire :

a - Conduite de l'hydrolyse :

Dans le bain-marie à température aisément réglable et fixée au degré désiré, installer un bécher de 30 ml, préalablement rincé avec la solution de lactose à 2%, y introduire 20 ml, exactement mesurés, de la même solution de sucre et l'obturer, à l'aide d'un gros bouchon de coton cardé, en évitant le contact bouchon-solution. Attendre que l'équilibre des températures se réalise.

Poser ensuite, à la balance de précision, une certaine quantité de Bêta-galactosidase, définie par l'essai en cours, qui sera dispersée, à l'aide du homogénéisateur, dans trente ml, prélevés avec exactitude, de tampon, dont les caractères sont sciemment déterminés ; prendre, avec une pipette de précision, 20 ml de cette suspension homogène de lactase, et les introduire dans le ballon non jaugé de 100 ml qui, bouché, est, à son tour, installé dans le bain-marie à température réglable. Attendre encore que l'équilibre des températures se réalise ; il est à noter que cet équilibre peut s'effectuer durant

\* Laboratoires EUROBIO précités.



l'étape qui suit.

Des essais préliminaires ayant montré que des hydrolyses rapides, qui nous intéressent, pouvaient avoir une fin apparente entre 8 et 14 minutes, porter sur 17 tubes de 1 cm de diamètre les chiffres de 4 à 20. Cette gamme de 4 à 20 permet, en fin d'expérience, de repérer facilement les hydrolyses lentes (temps, exprimé en minutes, nécessaire à une scission totale du lactose, supérieur à 20 minutes), des hydrolyses moyennes (temps compris entre 14 et 20 minutes), des hydrolyses rapides (temps compris entre 8 et 14 minutes). Mettre ensuite dans chacun des tubes une goutte de la solution saturée de  $\text{SO}_4 \text{ CU}$  (1)\*. Disposer les tubes, ainsi préparés, sur un portoir et installer celui-ci dans le bain-marie ordinaire dont la température est portée à  $100^\circ \text{C}$ .

L'équilibre des températures étant obtenu dans le ballon non jaugé de 100 ml et le bécher de 30 ml, enlever ce dernier de son support, l'essuyer rapidement et verser son contenu avec soin dans la fiole de 100 ml. Il est à signaler qu'il reste de la solution de lactose à 2 % sur les parois du bécher mais que, au départ, nous avons pris garde de rincer le bécher avec la solution sus-citée, et de jeter le produit de rinçage de la même manière que l'on verse (ces précautions sont prises pour opérer si possible exactement une dilution de moitié). Dès que le transfert est réalisé, mélanger intimement, par agitation, solution de sucre et suspension d'enzyme et déclencher le chronomètre. Il est bon de dire que le pH initial du tampon, où la lactase est dispersée, ne varie pas au cours de ces différentes manipulations.

Après 4 minutes d'attente opérer le premier prélèvement de 1 ml d'hydrolysate, à l'aide d'une pipette à écoulement aisé, et le porter immédiatement dans le tube intitulé n° 4 qui se trouve, par le fait des préparations antérieurement citées, dans le bain-marie ordinaire dont la température est de  $100^\circ \text{C}$ . Reboucher le ballon où se déroule l'hydrolyse. Réaliser les mêmes prélèvements, avec d'autres pipettes propres de 1 ml, après 5, 6 et 7 minutes; à ce stade, le prélèvement de la 7ème minute étant effectué, enlever le premier tube n° 4 du bain-marie bouillant et, l'ayant bouché, le laisser se refroidir jusqu'à la température ambiante. Il en sera ainsi jusqu'à la 20ème minute; les 21, 22 et 23èmes minutes ne verront plus que, successivement, le départ des tubes n° 18, 19 et 20 du bain-marie à  $100^\circ \text{C}$ .

(1)\* Remarque :

Le sulfate de cuivre et la température de  $100^\circ \text{C}$  stoppent immédiatement l'hydrolyse. Des essais ont, en effet, montré que 1 ml de la solution lactosée à 2 % et 1 ml d'une suspension d'enzyme aux caractères favorables à une dégradation glucidique rapide, versés conjointement dans un tube à essais, contenant deux gouttes d'une solution concentrée de  $\text{SO}_4 \text{ CU}$ , ne permettent pas, par chromatographie sur couches minces, après maintien à  $100^\circ \text{C}$  pendant 3 minutes et refroidissement naturel jusqu'à la température ambiante, de déceler la présence de glucose et de galactose néoformés. Le  $\text{SO}_4 \text{ CU}$  a, en outre, l'avantage de précipiter l'enzyme en un amas au fond du tube, ce qui facilite grandement le prélèvement des dépôts de chromatographie à opérer ultérieurement.

b - Chromatographie :

- Chromatographie proprement dite :

La technique utilisée est la technique de chromatographie sur gel de silice dont le processus d'utilisation a été décrit en première Partie. Mais,



le matériel employé est évidemment adapté ici à nos besoins ; en particulier, les dépôts sont à effectuer sur une plaque de 20 x 20 dont la ligne de départ de la migration est matérialisée par 18 touches très légères ; sur la première de ces touches, située à l'extrême gauche, déposer 1 mm<sup>3</sup> du mélange : 1 ml de la solution de lactose à 2 % + 1 ml du tampon utilisé lors de l'essai (ce dépôt met en évidence l'état du lactose à l'instant zéro de l'hydrolyse ; il montre, accessoirement, qu'en général les lactoses commerciaux, destinés aux laboratoires, sont, chromatographiquement parlant, exempts de glucose et de galactose) ; sur les 17 autres touches, réaliser un dépôt de 1 mm<sup>3</sup> du surnageant des 17 tubes, numérotés de 4 à 20, ayant reçu, lors de l'hydrolyse, les différents prélèvements. Puis réaliser la migration dans une cuve de 21 x 21 x 8,5.

#### - Révélation et lecture du chromatogramme :

Conduire la révélation comme il est dit en première Partie à l'aide du réactif au phthalate d'aniline.

Faire ensuite la lecture du chromatogramme qui, possible en lumière normale, est plus aisée en lumière ultraviolette de longueur d'onde 350 mμ. L'instant où l'hydrolyse nous apparaît comme totale, à l'aide de cette technique de chromatographie sur couches, est ainsi déterminé : la dégradation osidique étant supposée rapide ou moyenne (disparition du lactose entre 11 et 20 minutes), la fin de l'hydrolyse sera décelable sur la plaque même ; les différents spots, relatifs au lactose, iront aussi s'ameuisant de gauche à droite ; à un dépôt, correspondant à un certain instant de l'hydrolyse, aucune tache, relative au diholoside, n'est plus perceptible, alors qu'à l'instant précédent (soit au dépôt précédent), elle l'était encore ; c'est ce moment, où il n'y a plus de lactose décelable, qui marquera, pour nous, la fin de l'hydrolyse étudiée. La comparaison des différentes données obtenues (exprimées en minutes, la lecture étant faite en U.V.), propres à des hydrolyses menées dans des conditions variées, nous permettra de conclure quels sont les facteurs favorables à une scission rapide du lactose que nous recherchons.

#### C - Résultats :

##### 1 - Résultats accessoires à l'étude en cours :

De nombreux auteurs ont étudié l'évolution de réactions enzymatiques à l'aide de la technique de chromatographie sur papier ; COURTOIS ainsi, en 1962, a signalé (6) que la technique précitée pouvait permettre d'étudier "de visu" l'évolution par exemple, de l'action de la lactase sur un substrat tel que le lactose ; en fin de son mémoire, COURTOIS, toujours, présumait que, la technique de chromatographie sur couches minces permettait de grands espoirs ; d'autres, bien sûr, ont exploité les possibilités offertes par cette dernière, et, la technique d'hydrolyse proposée, décrite précédemment, avec explication de l'obtention des résultats par chromatographie sur couches, ne fait que modestement confirmer la puissance de résolution de la méthode sus-dite.

##### a - Etude de l'évolution d'une réaction enzymatique :

La photographie n° 3 p. 38 (prise en lumière normale artificielle et obtenue à partir du négatif d'un film Kodachrome ; diaphragme voisin de 9 ; pose 1/30 de seconde) fournit les résultats les plus intéressants. Lors de cet essai, les prélèvements d'hydrolyse ont été effectués toutes les dix secondes pendant la première minute, et toutes les trente secondes jusqu'à la septième minute incluse. (Remarque 1)\*.



La disparition progressive du lactose est nette, alors que galactose et glucose, visiblement séparés, apparaissent aussi nettement d'une manière continue ; d'autres sucres, dont l'origine serait à chercher dans d'éventuelles réactions de transfert, ne sont pas décelables ; on peut supposer que, dans ces conditions de travail, l'hydrolyse a déjà touché les oligosides apparus eux-mêmes, ou que ces derniers n'ont pas encore pris naissance, ou, comme POMERANZ (11), que les sucres néoformés migrent en commun avec les produits directs de la scission du lactose.

Signalons que l'intérêt d'un tel essai pourrait être, entre autre, de permettre l'étude de l'action de substances activantes de la Bêta-galactosidase qui, ajoutées à un certain instant au cours de l'hydrolyse, casseraient la continuité de la disparition du diholoside, ou l'action de substances inhibitrices qui, ultérieurement au moment d'introduction dans le milieu, fourniraient des spots, relatifs au lactose, d'intensité égale.

b - Exemple d'hydrolyse lente, moyenne ou rapide :

#### - Hydrolyse lente :

Nous avons caractérisé antérieurement comme étant une hydrolyse lente, une hydrolyse dont le moment, correspondant à la disparition totale du lactose, était situé, dans le temps, au-delà de 20 minutes. La photographie n° 4 p. 38 (prise en lumière normale artificielle et obtenue à partir du négatif d'un film Kodachrome ; diaphragme voisin de 9 ; pose 1/30 de seconde) nous offre l'image d'une telle hydrolyse (Remarque 2)\*.

#### - Hydrolyse moyenne :

La disparition du lactose a lieu entre 14 et 20 minutes. En lumière normale l'instant de cette disparition ne correspond évidemment pas à celui de la disparition en U.V. qui, nous l'avons vu, permettent de déceler une quantité moindre du sucre ; par exemple, sur la photographie n° 5 p. 39 (prise en lumière normale artificielle et obtenue à partir du négatif d'un film Kodachrome ; diaphragme voisin de 9 ; pose 1/30 de seconde), la disparition en lumière normale a lieu à 18 minutes et, en U.V., se situe au-delà de 20 (Remarque 3)\*.

#### - Hydrolyse rapide :

La disparition du lactose a lieu entre 8 et 14 minutes ; la photographie n° 6 p. 39 (prise en lumière normale artificielle et obtenue à partir du négatif d'un film Kodachrome ; diaphragme 9 ; pose 1/30 de seconde) représente une telle hydrolyse ; dans ce cas précis (remarque 4)\*, elle se termine à 7 minutes en lumière normale, et à 9 minutes en U.V.

#### Remarque 1\* :

Conditions de travail de l'essai SH n° 6 :

#### - Tampon phosphate utilisé :

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| force ionique dans le milieu = | 0,05 |
| pH =                           | 7,16 |

#### - Concentration en lactose dans le milieu =

1 ‰



- Concentration en enzyme dans le milieu = 1 partie d'enzyme pour 10 parties de sucre.
- Température d'hydrolyse = 42° C.

Remarque 2\* :

Conditions de travail de l'essai SH n° 15 :

- Tampon phosphate utilisé :
  - force ionique = 0,05
  - pH = 6,0
- Concentration en lactose = 1 %
- Concentration en enzyme = 0,5 partie pour 10 parties de sucre.
- Température d'hydrolyse = 42° C.

Remarque 3\* :

Conditions de travail de l'essai SH n° 13 :

- Tampon phosphate utilisé :
  - force ionique = 0,05
  - pH = 7,16
- Concentration en lactose = 1 %
- Concentration en enzyme = 0,5 partie pour 10 parties de sucre.
- Température d'hydrolyse = 42° C.

Remarque 4\* :

Conditions de travail de l'essai SH n° 12 :

- Tampon phosphate utilisé :
  - force ionique = 0,05
  - pH = 7,16
- Concentration en lactose = 1 %
- Concentration en enzyme = 2 parties pour 10 parties de sucre.
- Température d'hydrolyse = 42° C.



## 2 - Résultats concernant les meilleures conditions d'action de la Bêta-galactosidase étudiée :

### a - Détermination approximative des facteurs conduisant à une hydrolyse enzymatique rapide du lactose :

Le laboratoire, auprès duquel est obtenue la lactase mise en oeuvre, indique que de bonnes conditions d'emploi peuvent être :

- un pH dans le milieu de 7,2
- une température d'hydrolyse de 35 °C.

Par ailleurs, POMERANZ (11), ayant étudié quatre lactases dont une Bêta-galactosidase commerciale de levure, choisit comme température d'hydrolyse convenable 37° C, et détermine que le pH de 6 favorise la scission maxima du lactose.

D'autre part, CAPUTTO (14) étudie une lactase, ayant pour origine une culture de *Saccharomyces fragilis*, au pH de 6,8 et à la température de 30° C.

Ne connaissant pas l'exacte origine de notre produit, nous avons procédé à une série d'hydrolyses (au total 27) de manière à déterminer quelles étaient les zones de pH, de température et la concentration en enzyme favorables à une dégradation hydrolytique rapide et totale du lactose ; nous nous sommes imposés la force ionique du tampon phosphate (choisie égale à 0,05 dans le milieu réactionnel).

Le schéma n° 5 p.42 résume nos résultats ; nous pouvons y lire, en particulier, que l'hydrolyse la plus rapide (fin apparente en lumière normale = 7 minutes, fin apparente en U.V. = 8 minutes 30 secondes), se réalise à :

- un pH de 6,73
- une température de 42° C
- une concentration en enzyme de 2 parties de biocatalyseur pour 10 parties de sucre.

Il est également à noter qu'une autre hydrolyse rapide (fin apparente en lumière normale = 8 minutes 30 secondes, fin apparente en U.V. = 11 minutes) a lieu dans les mêmes conditions de pH et de température, mais à une concentration en enzyme de 1 partie pour 10 de sucre ; c'est pourquoi nous avons choisi cette concentration pour poursuivre nos essais, car la Bêta-galactosidase est un produit cher et que, pour une hydrolyse acceptable, nous en utilisons, dans ces conditions, deux fois moins.

### b - Détermination plus précise des facteurs conduisant à l'hydrolyse enzymatique rapide recherchée :

#### - Action de la force ionique :

Nous nous sommes imposés, au départ, la force ionique du tampon phosphate (0,05) ; mais à 42° C et au pH de 6,73, cette force ionique n'est



peut-être pas la meilleure. Le schéma n° 6 p.42 montre qu'aux conditions précitées 0,05 est la force ionique effectivement la plus favorable.

#### - Action du pH :

La force ionique étant de 0,05 et la température de 42° C, nous avons fait varier le pH de 6,6 à 7,0. Le schéma n° 7 p.43 indique que les pH qui favorisent une scission osidique rapide sont 6,7 et 6,8 ; au cours d'expérimentations ultérieures, nous avons aussi choisi un tampon aux caractères suivants :

- pH = 6,75
- force ionique dans le milieu = 0,05.
- Action de la température :

Lors des chap. II - II C - 2 a, nous avons déterminé que 42° C était, dans l'ensemble des essais, une température favorable ; mais, au pH de 6,75, la force ionique dans le milieu étant de 0,05, une température plus favorable encore peut éventuellement être déterminée. Une fixation plus précise de la température convenable, dont les résultats figurent sur le schéma n° 8 p. 43, montre qu'aux conditions de pH et de force ionique précitées 42° C est effectivement la température la meilleure.

#### 3 - Recherche d'activateurs éventuels :

CAPUTTO (14) étudie une lactase de levure à 30° et au pH de 6,7 - 7 ; dans son mémoire, il détermine que, dans certaines conditions, les ions  $Mg^{++}$ ,  $K^+$ , activent énergiquement la Bêta-galactosidase.

Nous inspirant de cet auteur, nous avons introduit par litre de tampon phosphate :

- soit 0,02 M de  $SO_4Mg$ , 7  $H_2O$  (d'où la concentration 0,01 M de ce sel dans l'hydrolysate)
- soit 0,2 M de  $Cl K$
- soit, indépendamment de CAPUTTO, 0,2 M de  $Cl Na$ .

L'introduction de ces sels dans le tampon modifie son pH initial ; ce dernier est aussi ramené à 6,75 par  $Na OH$ . Il est évident que les caractères du tampon phosphate, après correction, ont profondément changé. Ce milieu modifié n'améliore pas la rapidité de l'hydrolyse du lactose ; nous ne l'avons donc pas retenu.

#### D - Conclusion :

La technique d'hydrolyse proposée, jointe à la chromatographie en couches minces, permet d'étudier l'activité d'une enzyme et, en particulier, la rapidité de destruction d'un substrat. Cette possibilité a été mise à profit pour déterminer les conditions les plus favorables à une action optima de la lactase sur le lactose en solution aqueuse. Ces conditions, dans la limite de nos essais, se matérialisent par :

- l'utilisation d'un tampon phosphate de pH 6,75 et de force ionique 0,05 dans le milieu réactionnel.



- La fixation de la température d'hydrolyse à 42° C.
- La fixation de la concentration en enzyme à une partie de biocatalyseur pour 10 parties de lactose.

Nous pouvons remarquer au passage que les conclusions relatives au pH et à la température optima sont en désaccord avec les indications données par le fournisseur du produit.

Nous avons donc maintenant en main l'outil qui peut-être va permettre la scission totale du diholoside du lait, quand celle-ci est rendue nécessaire par la détermination chromatographique de plus de 0,5 g/l de lactose hydrolysé. Les pages qui suivent relatent l'essai d'application à des laits conservés.

### III - ESSAI d'APPLICATION à l'HYDROLYSE TOTALE du LACTOSE dans un LAIT -

#### A - Principe :

Connaissant les propriétés de l'enzyme utilisée, nous la ferons agir, dans les conditions déterminées comme les plus favorables, sur un volume défini d'un lait conservé. Conjointement, sur le même lait, nous effectuerons l'hydrolyse acide du lactose selon la technique mise au point par Mme RUIZ. Nous opérerons ensuite sur les hydrolysats acide et enzymatique un dosage réductimétrique des sucres, selon la méthode de G. BERTRAND.

Après avoir ainsi rappelé la technique d'hydrolyse de Mme RUIZ et exposé la nôtre, nous dresserons les résultats et concluerons quant à la valeur du schéma opératoire expérimenté par comparaison avec celui utilisé actuellement.

#### B - Technique d'hydrolyse de Mme RUIZ (1 - 2) :

##### 1 - Matériel nécessaire :

##### a - Matériel de défécation :

Voir chap. I - III - C - 1 - a.

##### b - Matériel d'hydrolyse :

- un ballon à acétylation de 100 ou 150 ml avec son réfrigérant à col rodé ou joint hermétique.
- un bain-marie susceptible d'être porté à 100° C.
- une fiole jaugée de 100 ml.
- Quelques pipettes de précision de différentes catégories.

##### 2 - Réactifs nécessaires :

##### a - Réactifs de défécation :

Voir chap. I - III - C - 1 - a.



## b - Réactifs d'hydrolyse :

### - I - Acide chlorhydrique environ 3 N.

Il est obtenu par la dilution à 1000 ml de 250 ml de Cl H pur de densité 1,19.

### - II - Soude environ 3 N.

Le volume de cette soude correspondant à 10 ml d'acide chlorhydrique I est déterminé.

## 3 - Hydrolyse :

### a - Obtention du filtrat dont le lactose supporte l'hydrolyse :

Voir chap. I - III - C - 1 - b, (cas des laits normaux ou formolés et bichromatés).

### b - Conduite de l'hydrolyse :

Prélever 25 ml du filtrat précédemment obtenu et les introduire dans le ballon à acétylation. Adjoindre 10 ml de la solution acide I (le pH du milieu est de 0,2 - 0,25). Adapter le réfrigérant au ballon à acétylation et porter, à l'aide du bain-marie, la fiole et son contenu à 100° C. Attendre 4 heures en surveillant l'ébullition. Refroidir. Neutraliser à l'aide du volume adéquat de la solution de soude II. Transvaser dans la fiole jaugée de 100 ml en rinçant le ballon à acétylation avec l'eau distillée de complément.

## 4 - Dosage des sucres :

Faire un dosage réductimétrique sur 20 ml de la dilution antérieure ne contenant plus, consécutivement à l'hydrolyse, que glucose et galactose. Relever le nombre de ml de  $MnO_4K$  N/10 versés et utiliser les tables mises au point par Mme RUIZ (1 - 2) pour obtenir la correspondance en poids de glucose et de galactose présents par litre de lait, et donc en lactose hydraté d'origine.

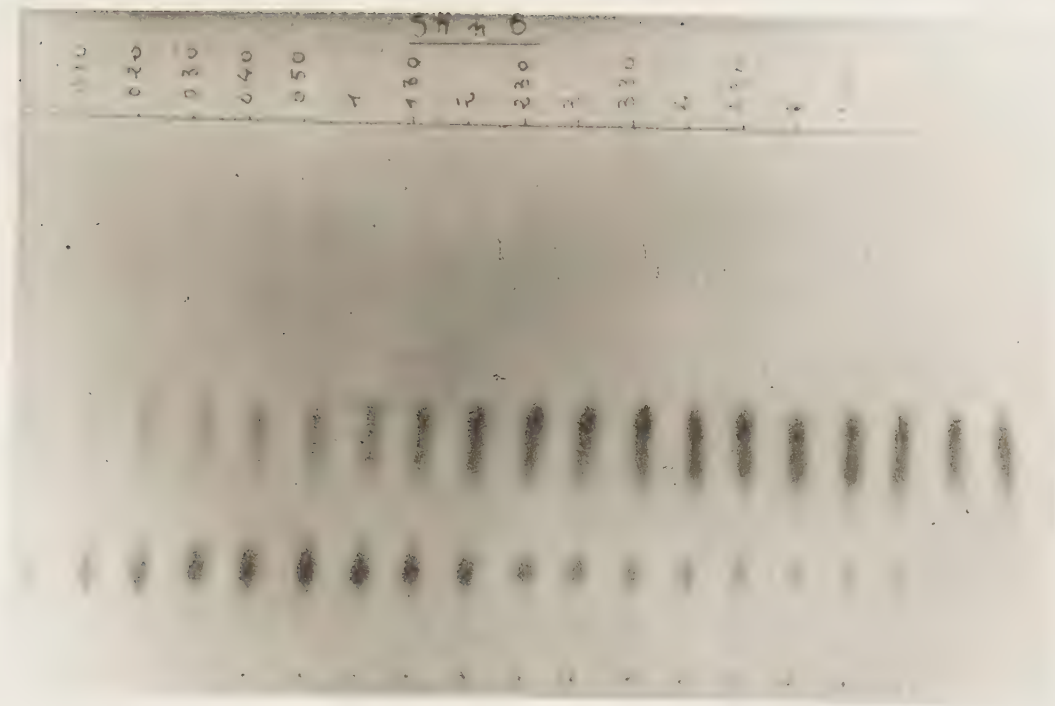
## C - Technique d'hydrolyse expérimentée :

### 1 - Matériel nécessaire :

#### a - Matériel d'hydrolyse :

- un ballon jaugé de 100 ml.
- un homogénéisateur.
- un bain-marie à température réglable.
- une balance de précision ( $\pm 1$  mg).
- quelques pipettes de précision de différentes catégories.





PHOTOGRAPHIE N° 3 : Evolution d'une réaction enzymatique.

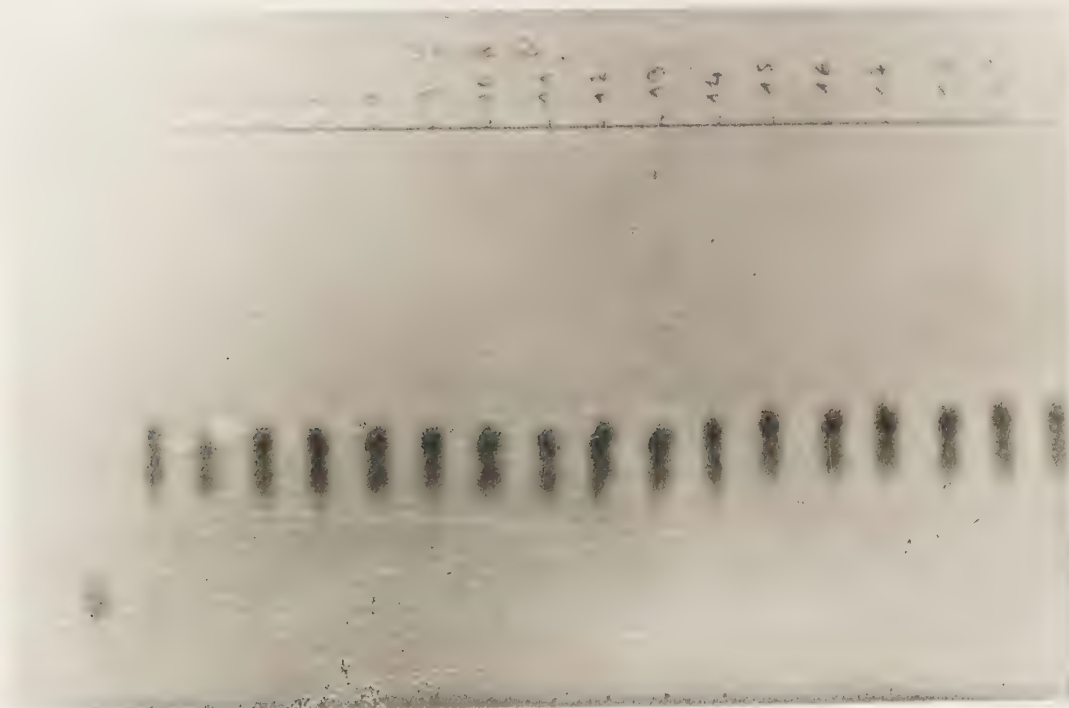


PHOTOGRAPHIE N° 4 Hydrolyse lente





PHOTOGRAPHIE N° 5 : hydrolyse moyenne.



PHOTOGRAPHIE N° 6 : hydrolyse rapide



b - Matériel de défécation :

La défécation a lieu dans la fiole jaugée de 100 ml précitée.

2 - Réactifs nécessaires :

a - Réactifs d'hydrolyse :

Voir chap. II - II - B - 2 - a.

- Bêta-galactosidase commerciale.

- Tampon phosphate de force ionique 0,1 et de pH 6,75 fait à partir de 3,95 g de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  et de 4,19 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , complétées à 1 l.

b - Réactifs de défécation :

Voir chap. I - III - C - 1 - a.

3 - Hydrolyse :

a - Conditions d'hydrolyse :

Lors d'un essai antérieur nous avons déterminé que la lactase utilisée agissait efficacement

- à 42° C

- au pH de 6,7 - 6,8 fourni par un tampon phosphate de force ionique, dans le milieu réactionnel, de 0,05.

- à une concentration de 1 partie d'enzyme pour 10 parties de sucre.

La durée pour une hydrolyse totale est alors, chromatographiquement parlant, de 11 minutes environ.

Ces conditions appliquées à 10 ml de lait, conduisent :

- au réglage du bain-marie à 42 ° C.

- à la dispersion de 50 mg d'enzyme dans 10 ml de tampon phosphate de force ionique 0,1 et de pH 6,75. Ces 10 ml de suspension enzymatique seront mélangés aux 10 ml du lait analysé (1)\*.

- à une durée d'hydrolyse de 30 minutes qui est plus du double de celle de l'hydrolyse dont les résultats ont été jugés les meilleurs ; ce laps de 30 minutes permet largement un équilibre convenable des températures.

(1)\* Remarque :

Le lait analysé est supposé avoir une teneur normale en sucre (50 g/l) ; désirant faire agir 1 partie de lactase sur 10 parties de lactose, à 10 ml de lait nous adjoindrons 50 mg d'enzyme.



La force ionique du tampon phosphate de pH 6,75 est à l'origine de 0,1 ; 10 ml de cette solution de phosphates mis en présence de 10 ml de lait fourniront, en faisant abstraction des sels contenus dans le lait, un mélange de force ionique 0,05. Il est à noter que, selon l'état du lait étudié, le pH dans le milieu réactionnel varie, le tampon n'amortissant pas suffisamment l'acidité élevée, par exemple, d'un lait fortement altéré ; or, il est difficile de ramener le pH modifié au pH de 6,75 sans changer profondément les caractères du milieu ; l'hydrolyse est-elle aussi conduite sans correction éventuelle de pH.

b - Conduite de l'hydrolyse :

Prélever 10 ml du lait analysé correctement homogénéisé (voir chap. II - III - C - 1 - b - remarque 1), et les introduire dans la fiole jaugée de 100 ml. Installer cette dernière dans le bain-marie préalablement réglé à 42° C. Attendre que l'équilibre des températures se réalise. Poser ensuite 75 mg de lactase et les disperser dans 15 ml de tampon phosphate à l'aide de l'homogénéisateur. Rincer une pipette de 10 ml avec quelques ml de la suspension enzymatique et prélever 10 ml de cette dernière ; les introduire dans la fiole jaugée et les mélanger soigneusement au lait à 42° C qui s'y trouve. Attendre 30 minutes. Refroidir à 20° C.

c - Contrôle de l'hydrolyse :

L'erreur tolérée au dosage réductimétrique du lactose après hydrolyse est de + 0,2 g/l. En conséquence, une action enzymatique ne laissant subsister au maximum que 0,2 g/l de lactose intact peut être considérée comme satisfaisante. C'est pourquoi nous avons fait migrer sur couches minces, selon la technique décrite précédemment :

- 1 mm<sup>3</sup> d'une solution étalon de sucres contenant 0,2 g de lactose et 49,8 g de glucose (1)\* par litre.
- 1 mm<sup>3</sup> de l'hydrolysate enzymatique concentré 10 fois (la dilution, comme nous le verrons, est de 10 lors de la défécation officielle) (2)\*.
- 2 mm<sup>3</sup> de l'hydrolysate acide concentré 10 fois (la dilution est de 20 lors de la défécation et des manipulations ultérieures conduisant à l'hydrolyse totale du lactose) (2)\*.

Après révélation au phtalate d'aniline, la lecture du chromatogramme est réalisée en lumière ultraviolette. Les spots éventuels, correspondant au lactose des trois solutions, sont comparés ; lorsque le spot possible du dihydroside de l'hydrolysate enzymatique a une intensité supérieure à celle du spot, toujours nettement déterminé en U.V., du lactose de la solution étalon, l'hydrolyse est considérée comme incomplète et non satisfaisante ; dans le cas contraire, elle est jugée convenable.

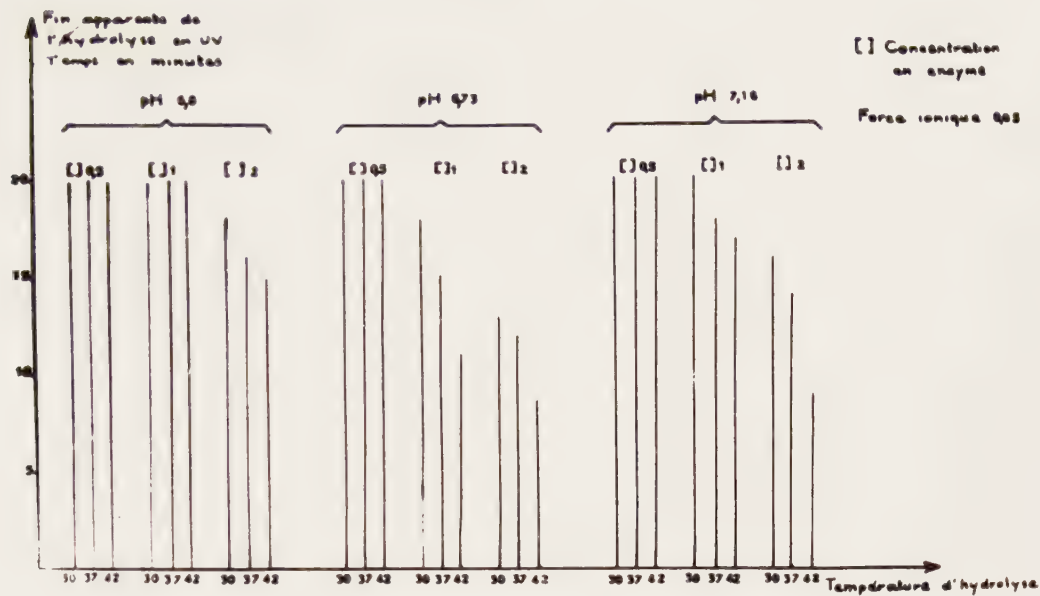
(1)\* Remarque :

Théoriquement cette solution de référence devrait contenir par litre :

- 0,2 g de lactose.
- 24,9 g de glucose.
- 24,9 g de galactose.



## DETERMINATION DES CONDITIONS D'HYDROLYSE



— SCHÉMA N° 5 : détermination des conditions d'hydrolyse. —

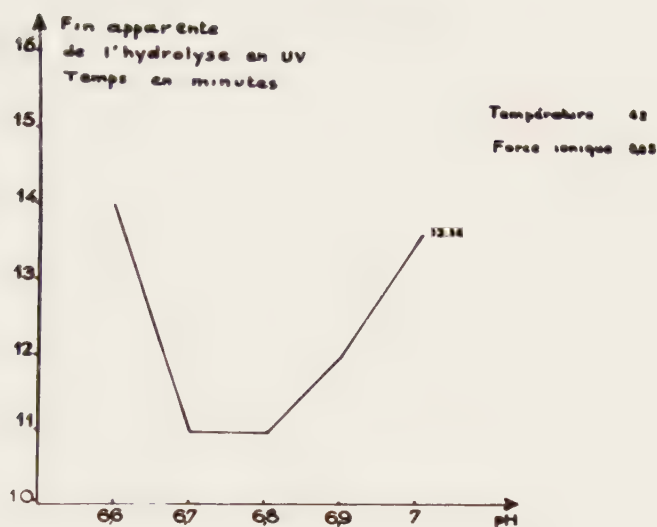
## ACTION DE LA FORCE IONIQUE



— SCHÉMA N° 6 : action de la force ionique sur le cours de l'hydrolyse. —

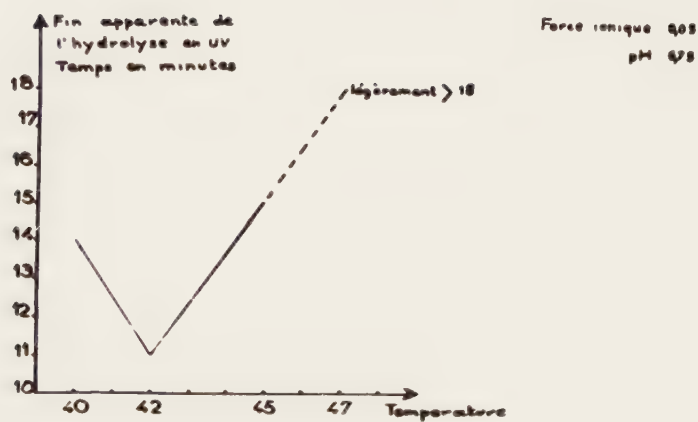


### ACTION DU pH



— SCHEMA N° 7 : action du pH sur le cours de l'hydrolyse. —

### ACTION DE LA TEMPERATURE



— SCHEMA N° 8 : action de la température sur le cours de l'hydrolyse. —



car la scission du lactose fournit en quantité équivalente du glucose et du galactose. Mais, aucun des galactoses commerciaux utilisés obtenus auprès de différents laboratoires, ne sont, chromatographiquement parlant, exempts de lactose, alors que les glucoses se révèlent purs. C'est pourquoi nous avons mis en présence 0,2 g de lactose et 49,8 g de glucose par litre, en émettant l'hypothèse que l'action éventuelle de 49,8 gamma de glucose est identique à l'action possible de 24,9 gamma de glucose + 24,9 gamma de galactose sur la migration de 0,2 gamma de lactose.

## (2)\* Remarque :

Nous avons signalé, au cours du premier Chapitre, que le gel de silice supportait aisément des dépôts de 5 mm<sup>3</sup> de solution aqueuse de sucres ; en opérant avec soin, il s'est avéré que des dépôts de 10 mm<sup>3</sup> étaient réalisables ; en revanche, ceux de 20 mm<sup>3</sup> sont très délicats à opérer sans une augmentation considérable de l'aire réceptrice sur la chromatoplaque qui ne favorise pas une figure chromatographique instructive. Or, sans concentration des hydrolysats, les dépôts à réaliser auraient été de :

- 1 mm<sup>3</sup> pour la solution de sucres de référence.
- 10 mm<sup>3</sup> pour l'hydrolysate enzymatique.
- 20 mm<sup>3</sup> pour l'hydrolysate acide dans lequel nous avons voulu confirmer l'absence de lactose signalée par Mme RUIZ.

Nous avons donc concentré les hydrolysats. La concentration de 5 ml se réalise en 5 heures environ, sous pression réduite, dans un dessiccateur à acide sulfurique plongé dans un bain-marie à 60 - 65° C, dont le bouchon permet le passage d'un capillaire ; l'extrémité de ce dernier est à 1 cm environ du liquide à évaporer et permet à un mince filet d'air sec (par passage dans un flacon laveur à acide sulfurique concentré) de balayer sa surface. Après évaporation totale, nous reprenons le résidu sec par 0,5 ml d'eau distillée. Les dépôts sont faits à partir de ces solutions concentrées. La présence de sels en plus ou moins grande quantité (cela est fonction de l'origine de l'hydrolysate) et de restes de protéides éventuels (cela est fonction de l'altération du lait) gêne un peu le déroulement de la chromatographie, mais n'interdit pas une lecture instructive du chromatogramme.

## 4 - Dosage des sucres :

L'hydrolyse enzymatique a lieu dans le lait non déféqué. Avant de doser les sucres, il est nécessaire de procéder à l'élimination des protéines et de la matière grasse.

### a - Défécation :

Voir chap. I - III - C - 1 - b (cas des laits normaux ou formolés et bichromatés). Il est cependant nécessaire de n'utiliser que le quart des quantités de produit indiquées, car, ici au lieu de 40, nous ne déféquons que 10 ml de lait.



b - Dosage proprement dit :

Réaliser un dosage réductimétrique, selon la technique de G. BERTRAND, sur 10 ml du filtrat de défécation et exploiter les résultats comme il est indiqué en chap. II - III - B - 4.

D - Résultats proprement dits :

1 - Résultats relatifs à l'étude en cours :

a - Résultats concernant les laits bichromatés (voir le tableau n° 9) :

- Laits bichromatés moyennement altérés (1)\* :

Cas des laits 1 RF, 2 RF, 3 RF, 4 RF, 5 RF.

La chromatographie sur couches minces révèle que l'hydrolyse par voie acide est totale ; elle montre également que la scission, par voie enzymatique, du lactose est complète. Mais, le dosage réductimétrique de l'hydrolysate enzymatique indique une quantité originelle de lactose supérieure de 0,35 à 1,45 g/l environ à celle fournie par le dosage des sucres dans l'hydrolysate acide, pris comme référence. Nous verrons plus loin l'origine éventuelle de cette différence.

- Laits bichromatés fortement altérés (1)\* :

Cas des laits 6 C, 7 C, 8 C.

La chromatographie du l'hydrolysate acide permet de ne déceler que du glucose et du galactose ; cette hydrolyse chimique est donc totale. En revanche, la scission hydrolytique, par la méthode enzymatique, est, en 30 minutes d'expérimentation, nettement incomplète : du lactose intact subsiste parfois en quantité importante (tache relative au lactose nettement déterminée sur la chromatoplaque).

b - Résultats concernant les laits formolés (2)\* (voir le tableau n° 10) :

Les résultats propres à ces laits sont voisins de ceux obtenus dans le cas des laits bichromatés fortement altérés : en 30 minutes d'expérimentation, dans le milieu réactionnel procuré par le mélange de 10 ml de lait analysé et de 10 ml de tampon phosphate où sont en suspension 50 mg d'enzyme, l'hydrolyse du lactose, bien que plus complète que dans le cas précité, ne se révèle pas totale. Par contre, l'hydrolyse acide est, chromatographiquement parlant, satisfaisante.

(1)\* Remarque :

La plus ou moins grande altération d'un lait bichromaté peut se déduire approximativement :

- d'un dégagement possible de gaz à l'ouverture du flacon.
- de l'odeur plus ou moins forte du lait.
- de la teinte prise par le bichromate qui peut aller du jaune verdâtre (altération moyenne) au vert terreux (altération profonde).



TABLEAU N° 9

## Résultats concernant les laits bichromatés

RF : lait aimablement fourni par le Service de la Répression des Fraudes.

C : lait conservé par nos soins.

p : lactose présent en quantité supérieure à 0,2 g/l.

A : lactose absent ou présent en quantité inférieure à 0,2 g/l.

Moy : moyenne

prof : profonde

|      | Ori-<br>gine | Alté-<br>re- | Chromato.<br>cat. avt hydrol- | dété-<br>rioration | Etude de l'hydrolysate<br>acide |            |                                                                          | Etude de l'hydrolysate<br>enzymatique |            |                                                                          |
|------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------------|---------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------|
|      |              |              |                               |                    | inf. ou<br>égale                | sup. à     | à chro-                                                                  | inf. ou<br>égale                      | sup. à     | à chro-                                                                  |
|      |              |              |                               |                    | 0,5<br>g/l                      | 0,5<br>g/l | ma-<br>to-<br>gra-<br>phic                                               | ma-<br>to-<br>gra-<br>phic            | 0,5<br>g/l | 0,5<br>g/l                                                               |
|      |              |              |                               |                    |                                 |            | Dosage sucres<br>ml MnO <sub>4</sub> K<br>N/10<br>Soit lact.<br>hyd. g/l |                                       |            | Dosage sucres<br>ml MnO <sub>4</sub> K<br>N/10<br>Soit lact.<br>hyd. g/l |
| 1 RF | moy.         | -            | +                             | A                  | 9,75                            | 32,37      | A                                                                        | 10,00                                 | 33,25      |                                                                          |
| 2 RF | moy.         | -            | +                             | A                  | 9,00                            | 29,78      | A                                                                        | 9,10                                  | 30,12      |                                                                          |
| 3 RF | moy.         | -            | +                             | A                  | 9,15                            | 30,30      | A                                                                        | 9,35                                  | 30,98      |                                                                          |
| 4 RF | moy.         | +            | -                             | A                  | 14,05                           | 47,71      | A                                                                        | 14,40                                 | 48,97      |                                                                          |
| 5 RF | moy.         | -            | +                             | A                  | 12,50                           | 42,13      | A                                                                        | 12,90                                 | 43,57      |                                                                          |
| 6 C  | prof.        | -            | +                             | A                  | 10,50                           | 35,01      | p                                                                        | 8,85                                  | 29,26      |                                                                          |
| 7 C  | prof.        | -            | +                             | A                  | 9,50                            | 31,51      | p                                                                        | 6,90                                  | 22,58      |                                                                          |
| 8 C  | prof.        | -            | +                             | A                  | 10,95                           | 36,60      | p                                                                        | 9,00                                  | 29,78      |                                                                          |



TABLEAU N° 10

## Résultats concernant les laits formulés

La légende des signes est identique à celle du tableau n° 9.

| Ori-<br>gine | Alté-<br>ra-<br>tion | Chromato-<br>cat. avt hydro-<br>Lactose prés.<br>en qté<br>inf. ou Sup. à<br>0,5 g/l | défè-<br>+ | Etude de l'hydrolysate<br>acide |                                       |                      | Etude de l'hydrolysate<br>enzymatique |                                       |                      |
|--------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
|              |                      |                                                                                      |            | chro-                           | Dosage sucres<br>ml $MnO_4^K$<br>N/10 | lact.<br>hyd.<br>g/l | chro-                                 | Dosage sucres<br>ml $MnO_4^K$<br>N/10 | lact.<br>hyd.<br>g/l |
| 1 RF         | moy.                 | -                                                                                    | +          | A                               | 11,55                                 | 38,72                | p                                     | 11,50                                 | 38,54                |
| 2 RF         | moy.                 | -                                                                                    | +          | A                               | 14,40                                 | 48,97                | p                                     | 14,00                                 | 47,53                |
| 3 RF         | moy.                 | -                                                                                    | +          | A                               | 14,15                                 | 48,07                | p                                     | 13,75                                 | 46,63                |
| 4 RF         | moy.                 | -                                                                                    | +          | A                               | 13,70                                 | 46,45                | p                                     | 13,20                                 | 44,65                |
| 5 C          | moy.                 | -                                                                                    | +          | A                               | 10,50                                 | 35,01                | p                                     | 10,05                                 | 33,42                |
| 6 C          | moy.                 | -                                                                                    | +          | A                               | 14,60                                 | 49,70                | p                                     | 14,00                                 | 47,53                |
| 7 C          | moy.                 | -                                                                                    | +          | A                               | 13,50                                 | 45,73                | p                                     | 13,10                                 | 44,29                |
| 8 C          | moy.                 | -                                                                                    | +          | A                               | 14,10                                 | 47,09                | p                                     | 13,65                                 | 46,27                |



## (2)\* Remarque :

L'altération de laits formolés ne peut être caractérisée que par l'odeur ou un dégagement gazeux éventuel à l'ouverture du flacon. Les laits RF et les laits C formolés, en prenant pour bases ces critères, semblaient avoir une altération similaire.

## 2 - Résultats accessoires à l'étude en cours : confirmation de faits connus

Le propre d'un conservateur convenable est de garder intact dans le temps l'état initial d'un produit. Le bichromate de potassium ou le formol, auquel est adjoint une pastille de trioxyméthylène, sont des conservateurs légalement utilisés pour la conservation des échantillons de lait. Or, l'étude de 16 laits altérés, résumée sur les tableaux n° 9 et 10, montre que dans 15 cas sur 16, les produits conservant ne sont pas efficaces dans la mesure où ils n'interdisent pas une hydrolyse partielle du lactose, le développement de l'acidité et une dégradation probable (odeur et dégagement gazeux dans le cas des laits bichromatés fortement altérés) d'autres constituants du lait.

Notre essai permet de mettre encore en évidence et de confirmer (voir les tableaux n° 9 et 10) que l'hydrolyse acide du lactose, rendue nécessaire par une scission du sucre supérieure à 0,5 g/l, est complète quand elle est exécutée dans les conditions déterminées par Mme RUIZ (1 - 2).

## E - Discussion et conclusion :

### 1 - Discussion :

L'hydrolyse enzymatique du lactose, dans le cas de laits bichromatés moyennement altérés apparaît, par chromatographie, comme complète. Les conditions d'hydrolyse conviennent donc. Mais, nous l'avons vu, le dosage réductimétrique des sucres néoformés indique une dose de lactose supérieure à celle donnée par le dosage de référence ; il y a donc, dans l'hydrolysate enzymatique, un facteur réducteur en supplément ; or, l'enzyme, chromatographiquement parlant, est exempte de sucres et, réductimétriquement parlant, n'a pas de pouvoir de réduction. Cet écart serait-il dû à la présence d'oligosides néoformés, modifiant le pouvoir réducteur de l'ensemble ? Ce point n'a pas été élucidé ; mais, il est à signaler qu'aucun de ces sucres possibles n'est, dans nos conditions opératoires, déterminable par chromatographie sur couches minces.

Le cas des laits bichromatés profondément altérés et des laits formolés posent un problème identique : l'hydrolyse, dans les conditions d'expérimentation proposée, n'est pas totale. Ces conditions ne conviennent donc pas. Une explication possible est l'acidité parfois très élevée (elle peut atteindre 110° Dornic) des laits bichromatés fortement altérés, qui est un des agents probables de la forte modification du pH dans le milieu réactionnel (il peut descendre à 5,5 - 5,6) ; ce pH bas ne favorise pas une action enzymatique énergique. L'hydrolyse incomplète, dans le cas des laits formolés, peut s'expliquer de son côté également par un abaissement sensible du pH (6,2 - 6,3) et par une action éventuelle retardatrice ou inhibitrice du formol et du trioxyméthylène sur le cours de l'hydrolyse.

### 2 - Conclusion et travail restant à faire :

Nous avons essayé, au cours de ce deuxième Chapitre, de déterminer



si une hydrolyse rapide du lactose d'un lait conservé était possible par voie enzymatique. Pour ce faire, nous avons déterminé les conditions d'une action optima d'une lactase commerciale ; outre les données recherchées, la technique d'hydrolyse mise en oeuvre permet, accessoirement, d'étudier l'évolution de l'action d'une lactase sur un substrat, tel que le lactose, qui libère des sucres lors de sa scission hydrolytique. Nous avons ensuite entrepris l'essai d'application sur 16 laits conservés. Celui-ci n'a pas fourni les résultats que nous escomptions, car, dans aucun cas, les résultats obtenus ne concordent rigoureusement avec ceux indiqués par la méthode de référence. Néanmoins un fait important demeure : l'hydrolyse enzymatique du lactose des laits bichromatés moyennement altérés est complète. Aussi, après avoir déterminé quelle est l'origine de l'écart entre les pouvoirs réducteurs d'un hydrolysate acide et d'un hydrolysate enzymatique, et éventuellement établi un coefficient de correction, serait-il intéressant de poursuivre l'étude en modifiant, par exemple, le temps d'hydrolyse, la dose d'enzyme et en examinant aussi attentivement les modifications du pH dans le milieu réactionnel de manière, en cas de variation importante, à le reconduire à la valeur favorable de 6,75.

Accessoirement cet essai a encore permis de confirmer que les conservateurs utilisés actuellement (bichromate et formol) ne sont pas sans défauts ; leur action de protection est réelle mais non totale. Le conservateur irréprochable est donc, dans le cas du lait, encore à déterminer. En revanche, l'hydrolyse chimique, mise au point par Mme RUIZ, se révèle être un bon outil de dosage du lactose dans un lait mal conservé par les produits précités.



## RESUME et CONCLUSION

Dans un lait frais le dosage du lactose se fait directement par réductimétrie. Dans un lait altéré, certaines précautions sont nécessaires ; ces précautions portent essentiellement sur la détermination des fermentations ayant pu se développer et sur le taux de lactose hydrolysé ; selon la nature de l'activité bactérienne, le dosage du lactose sera précédé automatiquement de certaines manipulations :

- dosage des composés résultant de la fermentation acétique.
  - dosage des composés résultant de la fermentation alcoolique.
  - dosage des composés résultant de la fermentation butyrique.
  - dosage de l'acide lactique  
etc .....
- seuls ou conjugués, et probablement dans tous les cas d'une hydrolyse totale du diholoside.

Dans les trois premiers cas précités, par exemple, l'évaluation du taux de lactose peut-être sujette à controverse, car les produits de fermentation ne sont plus nécessairement dans l'échantillon (dégagement gazeux possible). En revanche, dans la mesure où seule la fermentation lactique s'est développée, tous les produits, issus du diholoside, sont encore dans le lait offert à l'analyse ; nous y trouverons ainsi :

- de l'acide lactique, titré à la soude, en tenant compte de l'acidité apportée par les conservateurs.
- du glucose et du galactose.
- du lactose originel.

La mise en évidence d'une quantité totale de glucose et de galactose supérieure à 0,5 g/l impose, pour rester dans le domaine de l'erreur tolérée au dosage réductimétrique, l'hydrolyse complète du lactose résiduel.

La détermination de la quantité critique éventuelle de 0,5 g/l a été mise au point par Mme RUIZ ; elle se réalise à l'aide de la technique de chromatographie sur papier. Le mode opératoire de l'hydrolyse totale, par voie acide, qui, en cas de résultat positif à cette détermination, en découle, a été établi par le même auteur. Or, ces manipulations sont longues :

- 40 h au minimum pour déterminer si la quantité de lactose hydrolysé est supérieur à 0,5 g/l.
- 5 h au minimum pour l'hydrolyse chimique et les manipulations qu'elle implique.

En comparant ces temps, on peut songer qu'il est préférable, en cas d'analyse de lait altéré, de réaliser d'emblée l'hydrolyse totale du lactose sans attendre 40 h pour écarter éventuellement le dosage du lactose de 5 h environ. Notre but a aussi été d'améliorer, au point de vue durée, la technique



de la détermination de la quantité de lactose hydrolysé par litre de lait en utilisant la méthode rapide de chromatographie en couches minces ; cet essai est rapporté dans notre premier Chapitre. Le Chapitre second a porté sur la recherche d'un raccourcissement et d'une simplification possibles de l'hydrolyse totale du lactose à l'aide d'une Bêta-galactosidase commerciale.

Après avoir ainsi sélectionné un support de chromatographie, son diluant, un éluant, un révélateur et condensé, les résultats dans la description d'un mode opératoire, nous avons appliqué ce dernier à l'identification des sucres dans trois laits. Les résultats ont montré qu'il était possible de déterminer, en moins de 2 heures, si les laits analysés contenaient plus ou moins de 0,5 g de lactose hydrolysé par litre de lait, tout en simplifiant notablement les manipulations. Le gain est donc appréciable ; sa conséquence est qu'il est maintenant difficile d'hésiter à identifier les sucres de laits que l'on soupçonne d'être mal conservés pour cause de résultats longs à obtenir.

En revanche, l'essai de scission totale du lactose par voie enzymatique est moins concluant. S'il a, en effet, permis la description d'une technique d'hydrolyse permettant, parmi tant d'autres, de définir les meilleures conditions d'action d'une enzyme, d'étudier l'évolution de l'attaque du lactose par la lactase, s'il a permis encore de confirmer que les conservateurs légalement utilisés n'étaient pas d'une efficacité remarquable, il a montré que la scission hydrolytique totale du lactose ne pouvait être encore obtenue que par voie chimique selon la méthode proposée par Mme RUIZ.

Pour conclure nous proposons brièvement le schéma d'analyse suivant, destiné à fournir la valeur de la C.M.S. d'un lait altéré, où seule la fermentation lactique s'est développée :

- 1 - Homogénéisation correcte du lait.
- 2 - Recherche de l'acidité Dornic en tenant compte de l'acidité due aux conservateurs éventuels, d'où le taux d'acide lactique néoformé et du lactose transformé.
- 3 - Défécation de 40 ml de lait, rapportée dans le Chapitre premier.
- 4 - Identification, en moins de deux heures, des sucres, directement sur le filtrat précédent, en suivant strictement le mode opératoire décrit en première Partie.
- 5 - Faire en fonction des résultats de 4 :
  - Soit l'hydrolyse acide du lactose de 25 ml de filtrat fourni par la défécation de 3, selon la technique de Mme RUIZ, puis le dosage réductimétrique des sucres sur 20 ml de la dilution de l'hydrolysât obtenu.
  - Soit le dosage direct du lactose sur 5 ml du filtrat de 3.
- 6 - Dosage des chlorures sur 50 ml du filtrat obtenu en 3, éventuellement conjoint à un dosage réalisé à l'aide de la technique de l'attaque nitro-permanganique, préconisée par le Laboratoire Municipal de Paris.
- 7 - Calculer, grâce aux résultats de 2, 5 et 6, la C.M.S. du lait analysé.



1. Mme SAENZ LASCANO RUIZ I (1954). - Le dosage du lactose dans les laits altérés par fermentation lactique. Les conditions d'hydrolyse quantitative du lactose dans un lactosérum. Ann. Fals., 47, pp. 167 - 174 et 285 - 305.
2. GAUTIER J.A., RENAULT J., PELLERIN F. (1961). - Fiches techniques d'analyse bromatologique. Lait 13 III - IV, pp. 162 - 167.
3. STAHL E. (1962). - Dünnschicht - Chromatographie pp. 473 - 481. Springer - Verlag Berlin.
4. RAGAZZI E., VERONESE G., (1962). - Cromatografia di zuccheri su strato sottile di acido silicico. Il Farmaco - Ed. Pr. 13 fasc. 3 pp. 152 - 160.
5. FLORKIN M. (1956). - Aspects biochimiques communs aux êtres vivants. p. 334. Masson et Cie Editeurs - Paris.
6. COURTOIS J.E., PERCHERON F., (1963). - Récentes acquisitions sur l'identification chromatographique des oses et oligosaccharides. J. Pharm. Belg., 18, n° 7 - 8, pp. 303 - 320.
7. WALLENFELS K. (1961). - Galactosidasas. Adv. Carbohydrates Chem. U.S.A., 16, pp. 239 - 298.
8. WALLENFELS K., ZAMITZ M.L., LAULE G., BENDER H., KESER M. (1959). - Biochem. Z., 331, p. 459.
9. PAZUR J.H. (1954). - J. biol. chem. 208, p. 439.
10. PAZUR J.H., MARSH J.M., TIPTON C.L. (1958). - J. Am. chem. Soc. 80, p. 1433.
11. POMERANZ Y., ROBINSON R.J., SHELLENBERGER J.A. (1963). - Evaluation of Bêta-galactosidase (lactase) activity by paper chromatography - Enzymologia, Pays-Bas, 25, n° 3, pp. 157 - 166.
12. WOHNLICH J. (1963). - Etude de l'Alpha et de la Bêta-galactosidase du son. Evaluation de leur action hydrolisante et transférante. Bull. Soc. Chem. Biol. Fr., 45, n° 11, pp. 1171 - 1190.



13. REITHEL F.J., JAE CHANG KIM (1960). - Studies on the Bêta-galactosidase isolated from Escherichia coli ML 308 - I. The effect of some ions on enzymatic activity. Arch. Biochem. and Biophys, 90, pp. 271 - 277.
14. CAPUTTO R., LELOIR L.F., TRUCCO R.E. (1948). - Lactase and lactose fermentation on Saccharomyces fragilis. Enzymologie, 12, pp. 350 - 355.
15. Mme MARTELLI L., NAVELLIER P., (1952). - Homogénéisation mécanique des échantillons de laits frais ou altérés. Ann. Fals., 45, n° 519 - 520, pp. 101 - 108.
16. Analyses physique et chimique du lait (Méthodes officielles). Imprimerie des Journaux officiels. Paris.
17. WALLENFELS K., FISCHER J. (1960). - Z., physiol. chem., 321, p. 223.







DEUXIEME THESE

Proposition donnée par la Faculté :

DOSAGE DE LA MATIERE GRASSE DU FROMAGE.

COMPARAISON DES RESULTATS FOURNIS

PAR DES BUTYROMETRES NORMAUX ET DES BUTYROMETRES TYPE "HOLLANDAIS"

A CEUX OBTENUS PAR UNE METHODE D'EXTRACTION (S.B.R.).

Vu et approuvé

Nancy, le 8 Février 1965

Doyen de la Faculté des Sciences  
de Nancy

J.AUBRY.

Vu et permis d'imprimer

Nancy, le 10 Février 1965

Le Recteur

Président du Conseil de l'Université

P. IMBS





